

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
FACOLTA' DI AGRARIA**



**DOTTORATO DI RICERCA
IN AGROBIOLOGIA E AGROCHIMICA - XXIV CICLO
INDIRIZZO MIGLIORAMENTO GENETICO E ORTICOLTURA**

**Strumenti genomici per lo studio e l'uso
delle risorse genetiche di patata**

Tutore

Prof. Domenico Carputo

Coordinatore

Prof. Lorito Matteo

Candidata

Dott.ssa Valeria Miraglia

Indice

Capitolo 1	3
1. Introduzione	3
1.1 La patata in Italia e nel mondo	3
1.2 Le risorse genetiche in patata	4
1.3 Miglioramento genetico della patata	8
1.4 Genomica	11
1.4.1 Genomica strutturale	12
1.4.2 Genomica funzionale	17
1.4.3 Genomica comparativa	19
1.5 Miglioramento genetico molecolare.....	19
1.6 Obiettivi della tesi	24
Capitolo 2.....	26
2.1 Introduzione	26
2.1.1 Le specie selvatiche di patata e gli strumenti genomici	26
2.1.2 <i>Ralstonia solanacearum</i>	30
2.1.3 Il <i>Virus Y</i> della patata	31
2.1.4 Obiettivi.....	33
2.2 Materiali e Metodi.....	35
2.2.1 Materiale vegetale	35
2.2.2 Saggio di sensibilità a <i>Ralstonia solanacearum</i>	36
2.2.3 Analisi molecolari per individuare la resistenza a <i>R. solanacearum</i>	38
2.2.4 Saggio di sensibilità a PVY.....	39
2.2.5 Analisi molecolari per individuare la resistenza a PVY	40
2.2.6 Analisi SSR	41
2.3 Risultati	44
2.3.1 Saggio di sensibilità a <i>R. solanacearum</i> e analisi molecolari	44
2.3.2 Saggi di sensibilità a PVY e analisi molecolari	48
2.3.3 Analisi con i marcatori SSR.....	52
2.4 Discussione.....	60

<i>Capitolo 3</i>	69
3.1 Introduzione	69
3.1.1 Sequenziamento e analisi dei genomi	70
3.1.2 Genomica e genomica funzionale	71
3.1.3 Analisi dei genomi sequenziati	73
3.1.4 Obiettivi.....	75
3.2 Materiali e Metodi	77
3.3 Risultati	82
3.4 Discussione.....	102
 <i>Capitolo 4</i>	 110
4.1 Introduzione	110
4.1.1 I marcatori <i>Conserved Ortholog Set II</i> (COSII).....	113
4.1.2 <i>High Resolution Melting</i> (HRM).....	114
4.1.3 Obiettivi.....	117
4.2 Materiali e Metodi	118
4.2.1 Materiale vegetale	118
4.2.2 Estrazione del DNA	120
4.2.3 Selezione dei marcatori COSII (<i>Conserved Ortholog Set II</i>) ed amplificazione PCR	120
4.2.4 Purificazione e sequenziamento degli amplificati PCR	122
4.2.5 Sviluppo dei marcatori COSII specie-specifici	123
4.2.6 Messa a punto dell' <i>High Resolution Melting</i> (HRM)	124
4.3 Risultati	128
4.4 Discussione.....	137
 <i>Capitolo 5</i>	 142
5.1 Conclusioni.....	142
 <i>Bibliografia</i>	 145

Capitolo 1

1. Introduzione

1.1 La patata in Italia e nel mondo

La patata coltivata (*Solanum tuberosum* L.), appartenente alla famiglia delle *Solanaceae*, ha un ruolo di fondamentale importanza nell'equilibrio alimentare mondiale; si presenta, infatti, come la quarta coltura in termini di superficie investita e produzione, preceduta soltanto da colture cerealicole quali riso, frumento e mais. Probabilmente originaria del Perù e del Cile, si è ampiamente diffusa in Europa e altre parti del mondo a partire dal sedicesimo secolo, fino a diventare alimento prediletto nei paesi più ricchi o fonte principale di cibo per i paesi in via di sviluppo. Questo perché la patata può essere coltivata in ambienti dove altre colture fallirebbero, ma anche perché apporta elevate quantità di energia. La patata, infatti, è ricca di principi nutritivi con un alto potere saziante, pur avendo un contenuto di grassi molto basso. Il successo della patata in campo alimentare, quindi, è da ricollegare sia alla sua versatilità agronomica che alle sue proprietà nutrizionali. I tuberi di patata presentano un elevato contenuto in carboidrati ma sono anche un'ottimale fonte di minerali come potassio, magnesio e fosforo, nonché ferro il cui assorbimento è favorito dall'elevato contenuto di vitamina C. La patata, inoltre, è fonte di vitamina B1, B3 e B6, contiene fibre, proteine, acido folico, acido pantotenico, riboflavina e antiossidanti, che giocano un ruolo fondamentale nella diminuzione del rischio di malattie croniche (Burlingame et al., 2009).

La produzione mondiale di patata ammonta a circa 321 milioni di tonnellate coltivate su 19,2 milioni di ettari. Nel 2009 nell'Unione Europea la superficie destinata a tale coltivazione è stata di circa 2 milioni di ettari; in Italia è stata di circa 70600 ettari con una produzione annuale di 1.753.200 tonnellate (dati FAOSTAT 2010, <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>). Lungo tutta la penisola italiana è possibile individuare aree favorevoli per la pataticoltura, con produzione di tuberi pressoché ininterrotta lungo tutto il corso dell'anno. Nell'attuale quadro comunitario, l'Italia si colloca al nono posto in termini di superficie investita e al sesto in termini di produzione; in Italia, infatti, la patata rappresenta la coltura più diffusa dopo il pomodoro. La produzione nazionale di patata destinata al consumo, si compone di tre raccolti annui: la patata

precoce con coltivazione da novembre a maggio, la patata comune da aprile a settembre e la patata bisestile da agosto a dicembre. La quota principale del prodotto nazionale è costituita dalla patata comune, molto diffusa nelle regioni settentrionali. Nel sud Italia e principalmente in Campania, Puglia, Sicilia e Sardegna, invece, (grazie al clima mite invernale e alla piovosità) si evidenzia il 90% della produzione italiana della patata precoce. Quest'ultima, apprezzata per la sua freschezza, ha la peculiarità di essere raccolta con notevole anticipo rispetto alla patata comune e di essere considerata una coltura extra-stagionale.

Attualmente il sistema pataticolo nazionale presenta punti di debolezza legati alla frammentazione produttiva, alla scarsità di varietà selezionate e costituite in Italia e all'approvvigionamento di materia prima per le industrie di trasformazione. Quindi un fattore critico di successo per la pataticoltura sta nella capacità di sfruttare i vantaggi offerti dalle nuove tecnologie e dalla scienza, al fine di aumentare le produzioni e migliorare la qualità intrinseca ed estrinseca dei tuberi. La costituzione di varietà con caratteristiche migliorate spetta al miglioramento genetico, inteso come l'arte e la scienza utile nella gestione della genetica delle piante a beneficio dell'umanità. Il miglioramento genetico della patata ha in Italia enormi potenzialità, prefiggendosi come obiettivo prioritario la creazione di nuova variabilità genetica e la selezione di materiale più adatto agli ambienti italiani e alle varie tipologie produttive. A tale scopo, diventa fondamentale l'efficiente uso delle risorse genetiche.

1.2 Le risorse genetiche in patata

Il termine biodiversità comparve nel panorama scientifico internazionale nel 1978, durante la *First International Conference on Research in Conservation Biology*. Tale conferenza trattò temi come l'erosione della variabilità genetica tra le specie e sensibilizzò la comunità scientifica a tutela della biodiversità. Nel 1992 a Rio de Janeiro, con l'elaborazione della Convenzione sulla Diversità Biologica venne riconosciuta, per la prima volta nel diritto internazionale, la salvaguardia della biodiversità come "un compito comune a tutta l'umanità". La convenzione afferma il valore intrinseco della biodiversità e dei suoi vari componenti: ecologici, genetici, sociali ed economici, scientifici, educativi culturali, ricreativi ed estetici (<http://www.biodiversita2010.ch/>). Tale convenzione prevede tre principali obiettivi: la conservazione della variabilità biologica, l'uso sostenibile delle risorse genetiche e la giusta ed equa divisione dei benefici derivati dall'utilizzo di queste risorse. All'interno della convenzione viene poi fornita una definizione più completa del termine biodiversità; ad essa ci si riferisce come alla variabilità esistente entro tutti gli organismi viventi animali e vegetali, intesa anche

come variabilità genetica tra le specie e gli ecosistemi. L'Assemblea generale delle Nazioni Unite ha proclamato, inoltre, il 2010 come anno internazionale della biodiversità, con la speranza che gli stati colgano l'occasione per consolidare la sensibilizzazione sull'importanza della diversità biologica e per svolgere azioni locali, regionali ed internazionali a favore della conservazione della biodiversità.

Nel regno vegetale un significativo esempio di biodiversità è dato dalla famiglia delle *Solanaceae*: angiosperme dicotiledoni cui appartengono approssimativamente 95 generi e 3000-4000 specie, delle quali più della metà appartiene al genere *Solanum*. Alcune *Solanaceae* sono parte integrante o fondamentale dell'alimentazione umana (es. *S. tuberosum*, la patata; *S. lycopersicum*, il pomodoro; *S. melongena*, la melanzana), altre sono ornamentali (es. *Petunia hybrida*, la petunia; *Salpiglossis sinuata*, il salpiglossio; *Schizanthus pinnatus*, lo schizanto), altre vengono utilizzate per estrarre droghe farmaceutiche (es. *Nicotiana tabacum* e *N. rustica*, il tabacco; *Atropa belladonna*, la belladonna; *Mandragora officinarum*, la mandragola; *Duboisia spp.*, fonte di alcaloidi commerciali) (Knapp et al., 2004).

La patata presenta il più ampio e ricco germoplasma selvatico del regno vegetale. Al fine di preservare e tutelare la biodiversità in essa presente, perciò, sono state condotte spedizioni di raccolta di germoplasma in America centrale e meridionale, in quanto centri di origine e diversità delle specie di *Solanum*. Queste spedizioni hanno contribuito alla costituzione di banche di germoplasma di patata in tutto il mondo, tra cui ad esempio l'International Potato Centre (CIP, Lima, Perù) o il Potato Introduction Station (Sturgeon Bay, Wisconsin – USA) (Huaman, 1997), nonché banche di germoplasma disponibili *on-line* (<http://www.potatogenebank.org>).

Le specie selvatiche di *Solanum* presentano geni utili mancanti nelle varietà coltivate e rappresentano un serbatoio di variabilità da cui reperire i caratteri necessari per la costituzione di nuove varietà. Tra i caratteri più importanti si possono annoverare l'elevato contenuto in sostanza secca, il basso contenuto di zuccheri riduttori, la resistenza a stress biotici (funghi, insetti, nematodi, virus e batteri) e abiotici (in particolare freddo e siccità) e molti altri legati alla qualità e alla produttività. Sono inoltre fonte di diversità allelica necessaria ad ottenere eterosi per la produzione di tuberi e per altre caratteristiche soggette a controllo poligenico (Carputo e Barone, 2005). E' proprio sulla produzione di variabilità genetica che il miglioramento genetico della patata coltivata pone le sue radici, basandosi sull'enorme biodiversità presente nella famiglia delle *Solanaceae*. Il *breeding* moderno, infatti, è ormai privilegiato delle avanzate conoscenze scientifiche genetiche per l'uso di un numero quanto più ampio possibile di specie selvatiche (Bradshaw, 2007).

Le specie selvatiche di *Solanum* appartengono alla subsezione *Estolonifera* e alla subsezione *Potatoe*. Della prima fanno parte le specie che non producono tuberi, tutte riunite nella Serie *Etuberosa* (es. *S. etuberosum*), la seconda comprende 19 serie, con specie che producono tuberi. L'insieme delle specie selvatiche di patata forma una "serie poliploide" che comprende circa 200 specie, distribuite tra la parte Sud-Ovest degli Stati Uniti e la parte centrale dell'Argentina al confine con il Cile (Spooner e Hijmans, 2001). Il loro livello di ploidia è variabile dal diploide ($2n=2x=24$) all'esaploide ($2n=6x=72$) (Watanabe, 2002); la maggioranza delle specie selvatiche è diploide. Solitamente le specie diploidi sono autoincompatibili, mentre quelle tetraploidi ed esaploidi si autofecondano, pur presentando dopo alcune generazioni di autofecondazione problemi di depressione da inbreeding (Carputo e Frusciante, 2011). Le specie selvatiche, inoltre, possono interincrociarsi, dando vita ad ibridi fertili. L'ibridazione sessuale interspecifica è talvolta ostacolata da barriere sessuali post-zigotiche riconducibili al modello "*Endosperm Balance Number*" (EBN) proposto nel 1980 da Johnston et al. Il valore EBN definisce la possibilità che un incrocio tra le specie abbia successo e rappresenta l'effettiva ploidia della specie. Pertanto non si può prescindere dalla sua conoscenza se si vuole mettere a punto un programma di miglioramento genetico. L'EBN varia da 1 a 4 e gli incroci interspecifici hanno successo quando nell'endosperma ibrido si ha un rapporto di 2:1 tra EBN materno e paterno. Ciò è possibile solo quando i gameti dei due parentali hanno lo stesso valore di EBN, indipendentemente dal corredo cromosomico; negli altri casi l'endosperma degenera (Johnston et al., 1980). Differenze di EBN tra i parentali, quindi, impediscono l'ibridazione tra differenti ploidie entro e tra le specie. La patata coltivata ad esempio ha un EBN pari a 4, mentre molte specie selvatiche hanno EBN pari a 2; gli incroci tra le due non hanno successo se non si dimezza l'EBN della specie coltivata o si raddoppia la ploidia (attraverso poliploidizzazione sessuale o somatica) della specie selvatica.

Il germoplasma selvatico rappresenta la fonte più ricca di variabilità, ma non l'unica. Importanti risorse genetiche sono anche rappresentate da varietà coltivate, ecotipi, ibridi euploidi e aneuploidi e altri materiali sviluppati durante l'attività di miglioramento genetico, facenti parte del "*gene pool*" primario. Anche se la variabilità genetica in essi presente, è ridotta rispetto a quella presente nelle specie selvatiche, presentano comunque alcuni caratteri d'interesse per il miglioramento genetico. I membri facenti parte del *gene pool* primario, appartengono alla stessa specie e l'ibridazione sessuale tra loro avviene senza difficoltà; gli ibridi prodotti sono fertili e presentano un adeguato appaiamento cromosomico. Al *gene pool* secondario appartengono specie incrociabili con il *gene pool* primario, ma che a volte producono ibridi parzialmente fertili (l'appaiamento cromosomico può essere incompleto),

quindi, il trasferimento genico tra i due *gene pool* è possibile anche se difficoltoso. Al *gene pool* terziario, appartengono specie marginalmente compatibili sessualmente con i genotipi del *gene pool* primario; quando sono ottenuti, gli ibridi F₁ sono anomali, letali, 100% sterili; pertanto il trasferimento genico tra il *gene pool* terziario e il primario è impossibile con le tecniche convenzionali. Le risorse genetiche disponibili nei *gene pool* sono sempre più in espansione (Michelmore, 2003). Attualmente a disposizione dei miglioratori genetici vi sono altre fonti di variabilità, quali quelle presenti in tutti gli organismi viventi, inclusi i microrganismi, da cui sono stati isolati geni trasferiti in specie del *gene pool* primario, e che costituiscono il *gene pool* quaternario. Infine, risorse genetiche sono anche quelle rappresentate dalle crescenti informazioni di sequenza, dagli alleli di nuova formazione in silico e da quelli non presenti in natura ottenuti mediante il “DNA shuffling”, i quali costituiscono il *gene pool* di quinto livello (figura 1.1). L'utilizzo delle risorse presenti in questi ultimi *gene pool* è essenzialmente affidato ai nuovi strumenti genomici.

L'uso delle specie selvatiche, e delle altre fonti di variabilità, consente di ampliare la base genetica di *S. tuberosum*, la cui ristrettezza è dovuta principalmente al lavoro di selezione fatto nel tempo per caratteri specifici (Pavek e Corsini, 2001). Il miglioramento genetico della patata è reso difficile da numerosi fattori, tra cui ad esempio il livello di ploidia, ma potrebbe avvantaggiarsi degli approcci di genomica avanzata e dagli strumenti molecolari innovativi ormai ampiamente usati nel miglioramento genetico moderno.

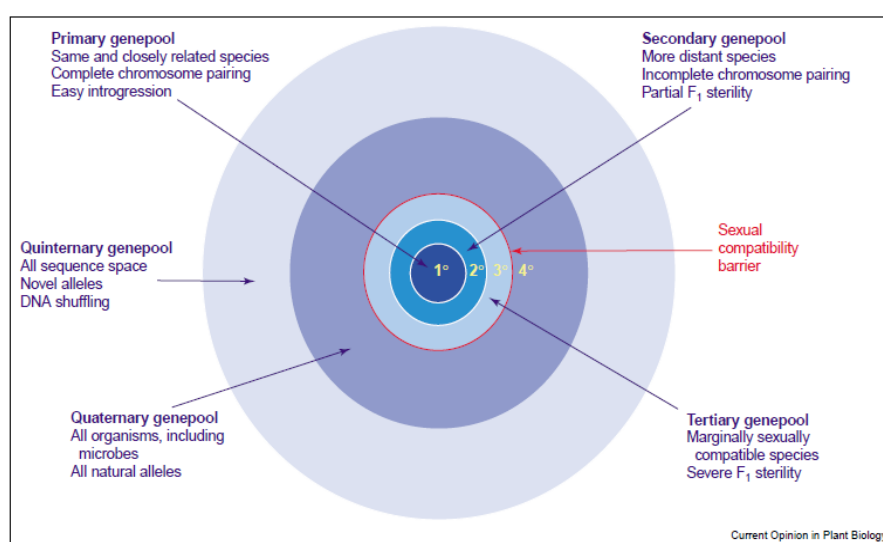


Figura 1.1: Espansione dei *gene pool* disponibili per il miglioramento genetico vegetale (Michelmore, 2003).

1.3 Miglioramento genetico della patata

Il miglioramento genetico consiste essenzialmente nella produzione di variabilità genetica e nella selezione al fine di ottenere una nuova cultivar. Nel 1807 in Inghilterra Knight spalancò le porte al *breeding* moderno con la messa a punto delle prime ibridazioni tra varietà di patata tramite impollinazione artificiale. L'introggressione di geni dalle specie selvatiche di patata in nuove cultivar ebbe inizio, invece, nel 1909 con risultati significativi ma molto limitati nel numero; infatti, fino alla fine degli anni '80 le specie selvatiche utilizzate nel miglioramento genetico di varietà europee erano poche, tra esse *S. demissum*, *S. stoloniferum*, *S. vernei*, *S. spegazzinii*, *S. chacoense* e *S. acaule*. Dalle prime due specie fu trasferita la resistenza alla *Phytophthora infestans* e da *S. vernei* e *S. spegazzinii* fu trasferita la resistenza al nematode *Globodera rostochiensis*.

Le caratteristiche genetiche della patata rendono difficile l'attività del miglioramento genetico e complicano gli studi sull'ereditabilità di caratteri utili per la costituzione di nuove varietà superiori. *S. tuberosum* è un tetraploide tetrasomico in cui, ad ogni locus, sono possibili cinque genotipi: AAAA (quadruplex), AAAa (triplex), AAaa (duplex), Aaaa (simplex), aaaa (nulliplex). Inoltre, come in tutti i poliploidi polisomici, è presente, oltre alla normale segregazione cromosomica, anche la segregazione cromatidica. Essa consiste in una deviazione dalla normale ripartizione degli otto cromatidi nella seconda divisione meiotica: nello stesso gamete possono trovarsi, infatti, due cromatidi fratelli. Tale fenomeno si verifica quando sono presenti appaiamenti a quadrivalenti e c'è *crossing-over* tra il locus ed il centromero.

Gli approcci tradizionali del miglioramento genetico della patata si incentrano sulla selezione di cloni provenienti da incroci 4x x 4x fra cultivar/cloni tetraploidi (Carputo e Frusciante, 2011). Il primo passo prevede la scelta dei parentali in funzione dei caratteri che si desidera conferire alla progenie, poi si effettuano gli incroci, quindi si allevano i genotipi derivanti da essi e, infine, si individuano i cloni agronomicamente superiori. Sebbene il *breeding* a livello tetraploide sia ancora molto diffuso, numerose altre metodologie affiancano e/o migliorano gli approcci tradizionali.

L'ibridazione sessuale interspecifica, che si basa sull'incrocio tra specie coltivata e specie selvatiche, è la strategia che meglio consente di accedere al ricco patrimonio genetico delle specie selvatiche. Essa spesso si realizza attraverso la manipolazione dei livelli di ploidia (ingegneria genomica) per superare barriere sessuali o differenze del corredo cromosomico tra i parentali (Carputo e Barone, 2005). A differenza dell'ingegneria genetica, in cui il trasferimento di geni avviene attraverso sistemi biotecnologici non riconducibili ad eventi di

ricombinazione sessuale, l'ingegneria genomica in patata si basa sulla possibilità di ridurre i livelli di ploidia tramite aploidizzazioni o di incrementarli tramite poliploidizzazione sessuale o somatica. Le varietà coltivate di patata sono tetraploidi ($2n=4x=48$), mentre molte specie selvatiche sono diploidi ($2n=2x=24$), pertanto gli incroci $4x \times 2x$ tra varietà tetraploidi e specie diploidi non sono possibili; nei programmi di miglioramento genetico le modifiche del livello di ploidia del parentale coltivato permettono l'incrocio con le specie selvatiche contenenti i caratteri desiderati. Così come riportato in figura 1.2 riquadro A, dalle varietà coltivate tetraploidi vengono ottenuti individui aploidi (con corredo cromosomico somatico $2n=2x=24$), che possono essere facilmente incrociati con molte specie diploidi, ottenendo ibridi diploidi che, se produttori di gameti $2n$, possono essere incrociati con varietà tetraploidi al fine di ottenere progenie tetraploidi portatrici dei geni d'interesse. Lo schema descritto, tuttavia, non è sempre utilizzabile per la presenza di meccanismi di isolamento sessuale post-zigotici. Per superare tali incompatibilità tra specie selvatiche diploidi $2x(1EBN)$ e aploidi di varietà coltivate $2x(2EBN)$ sono possibili approcci basati sulla produzione di ploidie ponte F_1 triploidi, così come mostrato in figura 1.2 riquadro B. Questa strategia, descritta da Carputo et al. (1997), consente la manipolazione di interi set di cromosomi per il trasferimento diretto di germoplasma *in vivo* dalla specie selvatica *S. commersonii* $2x$ alla specie coltivata *S. tuberosum* $4x$. Le ploidie ponte triploidi possono essere prodotte mediante incroci tra la specie selvatica ($2x$) e la varietà coltivata ($2x$), qualora il parentale selvatico produca gameti $2n$ o, in caso ciò non avvenga, attraverso incroci tra la specie selvatica ($4x$) e la varietà coltivata aploide ($2x$), sottoponendo il parentale selvatico ad un processo di poliploidizzazione somatica per raddoppiare il corredo cromosomico, in modo da renderlo compatibile con gli aploidi della varietà coltivata. Gli ibridi $3x$ ottenuti dall'incrocio $4x \times 2x$, se produttori di gameti $2n$ possono essere reincrociati con le varietà tetraploidi, producendo ibridi pentaploidi. Prodotti gli ibridi pentaploidi, risulta poi relativamente facile procedere con i reincroci, in quanto i pentaploidi sono facilmente incrociabili con *S. tuberosum*.

Il successo di questo tipo di approccio è ampiamente documentato in letteratura. Ad esempio Carputo et al. (2009) hanno trasferito la resistenza a *Ralstonia solanacearum*, freddo e marciume molle in ibridi sessuali pentaploidi ottenuti con ploidie ponte tra *S. commersonii* e *S. tuberosum*.

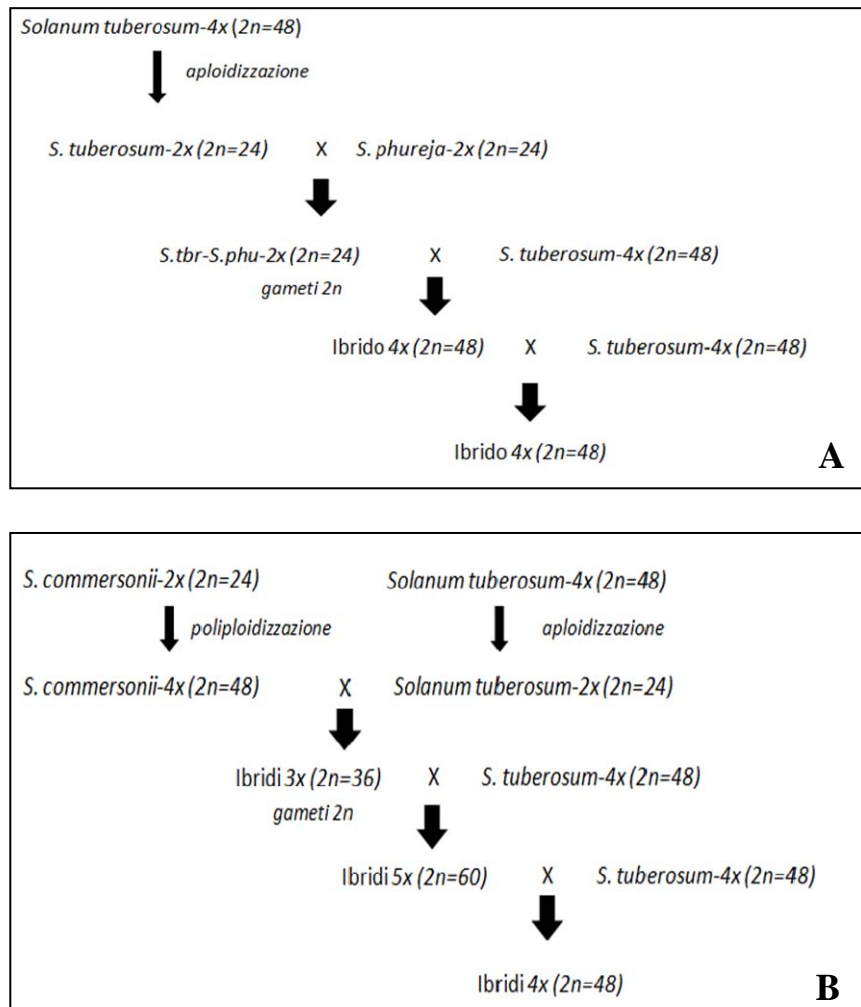


Figura 1.2: Schema di miglioramento genetico ottenuto mediante ibridazione sessuale a livello diploide, basato sull'utilizzazione di specie selvatiche diploidi compatibili con gli aploidi di *S. tuberosum* (riquadro A) e mediante ibridazione sessuale tramite l'utilizzo di ploidie ponte (3x e 5x) (riquadro B).

Tra le strategie che consentono l'uso della biodiversità di patata vi è anche la fusione somatica, che permette di produrre ibridi attraverso la fusione di protoplasti di due genotipi parentali e la successiva rigenerazione *in vitro* di genotipi ibridi (Liu et al., 2005). La fusione somatica consente di superare le barriere di incompatibilità tra le specie, permettendo di combinare due interi genomi, nonché l'informazione genetica presente nei mitocondri e nei cloroplasti. In molti programmi di miglioramento è utilizzata anche la trasformazione genetica, che risulta essere la tecnica più veloce per introgredire caratteri utili; essa è basata sul trasferimento in pianta di singoli geni di interesse provenienti da batteri, virus e altre specie vegetali (Tang et al., 2008). Negli ultimi anni si è molto diffusa la cisgenesi che migliora il processo di trasformazione genetica. Infatti, i geni trasferiti non provengono da organismi diversi dalle specie vegetali che bisogna modificare, ma dalle stesse specie o da specie

incrociabili con esse (Jacobsen e Schouten, 2008). La cisgenesi prevede un unico step, e non ha problemi di *linkage drag* (Jacobsen e Schouten, 2007).

Molte strategie di miglioramento genetico, soprattutto quelle basate sull'ibridazione interspecifica, hanno lo svantaggio di produrre ibridi che, nonostante le caratteristiche utili, presentano caratteri indesiderati e che comportano una riduzione della fitness; questo fenomeno prende il nome di *linkage drag*. Per questa ragione l'attenzione dei miglioratori è attualmente rivolta verso la genomica e allo sviluppo o utilizzo di tecniche molecolari innovative che, associate alle risorse genetiche disponibili nell'ambito delle specie selvatiche di patata, permettano d'integrare le tecniche di miglioramento genetico classico al fine di migliorare la base genetica della patata coltivata.

1.4 Genomica

La genomica è la scienza che si occupa dello studio del genoma, con una visione d'insieme alla sua struttura (genomica strutturale) e funzione (genomica funzionale), integrando entrambi gli approcci per uno studio più completo delle sequenze geniche degli organismi. Il termine genoma fu introdotto all'inizio del ventesimo secolo, per designare il set aploide di cromosomi, ma con l'avvento della genetica molecolare il significato di questo termine si è evoluto nell'indicare tutto il materiale genetico di un organismo sia unicellulare che pluricellulare o virus (Zelenin et al., 2001). La genomica integra la biologia molecolare, la citologia, la genetica classica, quantitativa, di popolazione e molecolare con le nuove tecnologie derivanti dall'informatica e dai sistemi automatizzati e robotizzati. La genomica può essere considerata una branca della genetica, ma differisce da essa in quanto non si occupa dell'azione specifica di uno o pochi geni per volta, ma studia l'azione contemporanea di tutti i geni. I risultati prodotti negli studi di genomica forniscono, quindi, gli strumenti genici utili per aumentare l'efficienza dei metodi del miglioramento genetico tradizionalmente usati.

La genomica nel sistema patata ha spiccato il volo solo all'inizio del nuovo millennio fino ad avere oggi a disposizione della comunità scientifica risorse genetiche pari o superiori alle altre specie vegetali (Bryan, 2007). Ad oggi per la patata sono state sviluppate molte mappe genetiche allo stadio diploide. Ulteriore contributo alla ricerca e al miglioramento genetico verrà dalla sequenza genomica. Essa è stata generata dal Potato Genome Sequencing Consortium nel 2011 sul doppio monoploide di *S. phureja* DM1-3 516 R44 (DM) integrando i dati di sequenza dell'eterozigote diploide *S. tuberosum* RH89-039-16 (RH).

1.4.1 Genomica strutturale

La genomica strutturale riguarda l'organizzazione fisica del genoma come l'assetto cromosomico (cariotipo), la struttura e la distribuzione dei geni, compresi gli elementi non codificanti. Pertanto gli strumenti che la caratterizzano sono rappresentati dai marcatori molecolari e dalle mappe genetiche, nonché dalle sequenze di DNA e dalle mappe fisiche.

La genomica strutturale ha mosso i primi passi con la costruzione delle prime mappe genetiche, che hanno ampliato le conoscenze sull'architettura di vari caratteri tra cui resistenza a malattie, qualità dei tuberi e dormienza, fino a portare all'isolamento di taluni geni. Dall'analisi delle mappe di associazione genetiche, infatti, è possibile risalire alla localizzazione dei geni sulla base dell'associazione del carattere d'interesse a determinati marcatori molecolari presenti sulla mappa. Quest'ultima è una vera e propria rappresentazione grafica delle distanze genetiche presenti tra i vari marcatori studiati. Mappare loci singoli è una procedura piuttosto facile, a differenza della mappatura dei caratteri quantitativi (QTL, *Quantitative trait loci*), che influenzano molti caratteri agronomicamente importanti come la resa produttiva, la maturità, la resistenza. Essi sono controllati da più loci, ognuno dei quali contribuisce al fenotipo che varia a seconda dell'espressione genica e degli effetti ambientali (Kumar, 1999). Con l'avvento dei marcatori molecolari e delle mappe genetiche è stato possibile studiare con maggiore precisione anche questi caratteri, tanto che in patata sono stati mappati QTL che controllano la maturità, la resistenza quantitativa alle malattie e la qualità del tubero.

Le mappe genetiche saturate con diversi tipi di marcatori molecolari (RFLP, AFLP, SCAR, SSR, ecc.) vengono spesso usate per la selezione assistita (MAS) e per studi di genomica comparativa. La selezione assistita da marcatori molecolari ha notevolmente aumentato l'efficienza del miglioramento genetico, consentendo di selezionare rapidamente anche quei caratteri per cui il fenotipo è difficile da valutare (Collard e Mackill, 2008), evitando la distruzione del materiale vegetale e riducendo errori e spazi necessari per la valutazione. L'accuratezza della selezione assistita si basa sulla disponibilità di marcatori molecolari che siano localizzati quanto più vicino possibile al gene d'interesse, per evitare che eventi di ricombinazione facciano perdere l'associazione tra marcatore e gene.

Un esempio dell'applicazione dell'analisi genomica molecolare nel miglioramento genetico è rappresentato dalle collezioni di NILs (*Near Isogenic Lines*). L'analisi delle NILs consente d'identificare i marcatori strettamente associati al gene d'interesse e ciò è utile per mappare i geni responsabili dei tratti fenotipici d'interesse, ma anche per studi di variazione

allelica dei QTL (Monforte et al., 2001). L'analisi delle NILs è importante per chiarire la funzione di geni singoli (Tsujiimoto, 2001) e in studi di biochimica e fisiologia comparativa dei geni. Ad esempio, attraverso le NILs sono stati identificati QTL associati alla resistenza alle basse temperature in pomodoro (Goodstal et al., 2005).

I marcatori molecolari sono senza dubbio tra gli strumenti molecolari più usati per lo studio dell'organizzazione dei genomi. Sono stati utili nel rilevare il grado di conservazione dell'ordine delle sequenze nucleotidiche e della localizzazione di segmenti cromosomici nei genomi di specie tassonomicamente vicine, nonché per studi evolutivisti basati su progenitori comuni. I marcatori molecolari, infatti, hanno il vantaggio di essere stabili e rilevabili in ogni tessuto, indipendentemente dallo stadio di sviluppo e di differenziazione, di riuscire a coprire qualsiasi parte del genoma (trascritta e non, introni e regioni regolatrici) senza subire interferenze da parte dell'ambiente, trattandosi di differenze a livello del DNA. I marcatori, inoltre, consentono di rilevare differenze anche tra individui geneticamente simili e fenotipicamente indistinguibili senza presentare effetti epistatici e pleotropici. Agarwal et al. (2008) definiscono un marcatore molecolare come un segmento del DNA rappresentativo delle differenze presenti tra gli organismi a livello genomico. Queste differenze sono le alterazioni genotipiche (polimorfismi) presenti anche in individui fenotipicamente identici, caratterizzate da mutazioni quali inserzioni, delezioni, traslocazioni, duplicazioni e sostituzioni a singolo nucleotide. I marcatori molecolari hanno facilitato la comprensione delle basi genetiche di caratteri complessi, del loro meccanismo d'azione e di come la loro funzione è modulata dall'ambiente. Essi consentono di caratterizzare geneticamente una varietà (fingerprinting) e di distinguerla dalle altre dal punto di vista genetico, contribuendo alla tracciabilità delle produzioni alimentari.

Nelle ultime due decadi si è assistito a un grosso sviluppo nell'utilizzo dei marcatori molecolari per studi genomici. L'uso dei marcatori del DNA è iniziato con gli RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) basati sugli enzimi di restrizione, ed è culminato con i marcatori basati sui polimorfismi del singolo nucleotide (SNPs). Quest'ultimi sono diventati i marcatori di prima scelta per numerosi studi perché sebbene richiedano informazioni di sequenza, sono abbondanti nel genoma e uniformemente distribuiti. Lo studio degli SNPs oggi rappresenta un tipico esempio di analisi molecolare applicata al miglioramento genetico. Essi consentono, infatti, di identificare differenze puntiformi tra i genomi. Con la disponibilità della tecnologia microarray è stato possibile studiare centinaia di SNPs contemporaneamente. Negli ultimi anni, ad esempio, sono stati sviluppati i marcatori DArT (*Diversity Arrays Technology*) basati sui supporti solidi di tipo array, sugli SNPs e sui siti di restrizione; che

permettono di superare alcune delle limitazioni dei marcatori molecolari più diffusi (RFLP, AFLP, SSR, ecc.). Essi non richiedono informazioni di sequenza preacquisite, pertanto sono applicabili a tutti quegli organismi per cui non sono disponibili tali informazioni e vengono usati in studi di genomica funzionale, per la costruzione di mappe ad elevata densità, analisi QTL e analisi di diversità genetica (Gupta et al., 2008). Proprio questi marcatori insieme ai microsatelliti e ai COSII sono stati usati nel presente lavoro di tesi, pertanto ne segue una breve panoramica.

La tecnologia DArT prevede la creazione di una rappresentazione genomica, ovvero di una frazione (10%) specifica del genoma di un campione o di un gruppo di campioni, ottenuta mediante digestione (figura 1.3a), ligazione dei frammenti ad adattatori e successive amplificazioni selettive degli stessi, secondo un procedimento AFLP-simile. In tal modo viene ridotta la complessità genomica al fine di ottenere una frazione rappresentativa dell'informazione genetica del campione in esame. Successivamente i frammenti amplificati vengono clonati (figura 1.3b) e con l'ausilio di un robot, gli ampliconi prodotti vengono depositati su un vetrino (di tipo array) (figura 1.3c). A questo punto il vetrino prodotto può essere utilizzato per identificare marcatori DArT attraverso l'ibridazione (figura 1.3d) di campioni di DNA derivanti dalla rappresentazione genomica. Finora, la tecnologia DArT è stata applicata con successo in riso (Jaccoud et al., 2001), orzo (Wenzl et al., 2004) cassava (Xia et al., 2005) e in altre specie vegetali per la caratterizzazione di germoplasma, per la costruzione di mappe genetiche, per la selezione assistita da marcatori molecolari e per studi di diversità dovuta a cambiamenti epigenetici (metilazione del DNA).

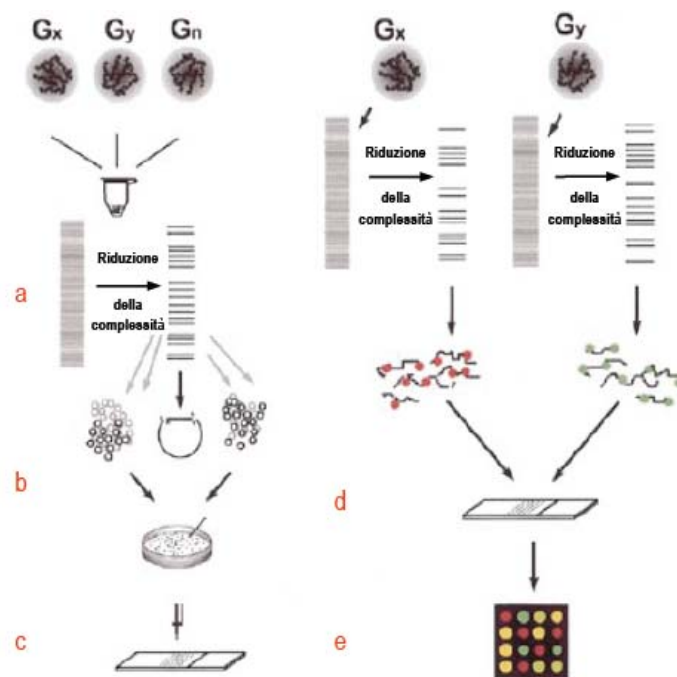


Figura 1.3: Schema della tecnica di analisi molecolare DArT (*Diversity Array Technology*). Le fasi del processo sono indicate dalle lettere: a) digestione con enzimi di restrizione; b) clonaggio dei frammenti digeriti e amplificati; c) stampa sul vetrino dei frammenti clonati; d) ibridazione; e) identificazione marcatori polimorfici DArT.

I microsatelliti, definiti anche *Simple Sequence Repeats* (SSR) (Jacob et al., 1991), consistono di corti motivi di di-, tri-, tetra-, o pentanucleotidici ripetuti in tandem, le cui regioni confinanti sono molto conservate, ed è proprio su queste che vengono disegnati i primers per l'amplificazione PCR. Gli ampliconi presentano variazioni nella lunghezza dovute a variazioni alleliche nel numero di ripetizioni del motivo o alla presenza di mutazioni puntiformi all'interno del microsatellite (Gebhardt, 2007). Le variazioni nel numero di ripetizioni sono dovute allo scivolamento della polimerasi durante la replicazione, che comporta l'inserzione o la delezione di ripetizioni, oppure ad eventi di *crossing-over* ineguale tra cromatidi omologhi (Innan et al., 1997). La patata presenta elevata eterozigotà per gli alleli SSR, pertanto vengono molto usati in studi di biodiversità, strutture genetiche e classificazioni (Spooner et al., 2007), *fingerprinting* (Moisan-Thiery et al., 2005) e linkage *disequilibrium* (Remington et al., 2001; Stich et al., 2005).

I marcatori molecolari COSII (*Conserved Ortholog Set II*) sono marcatori sviluppati da geni ortologhi e basati sulla tecnica PCR, essi rappresentano geni conservati e presenti in singola copia nelle famiglie delle *Solanaceae* e delle *Rubiaceae* e sono strettamente correlati al genoma di *Arabidopsis* (Wu et al., 2006). L'uso di geni ortologhi a singola copia nei genomi

vegetali, ha consentito di progredire più rapidamente nell'ambito della genomica comparativa (Fulton et al., 2002) e in studi filogenetici (Wu et al., 2006).

Le mappe genetiche, insieme alle librerie BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*) e alle collezioni EST (*Expressed Sequence Tag*) rappresentano le risorse genomiche utili per il clonaggio, la costruzione di mappe fisiche e l'analisi del trascrittoma.

Una mappa fisica si ottiene dall'insieme di tratti di DNA cromosomico (*contig*) in cui la distanza tra i marcatori è stimata sulla base della reale distanza nucleotidica. Mira a raggruppare tutti i frammenti di DNA clonati in grossi vettori come BAC o YAC (*Yeast Artificial Chromosome*) e a dare una rappresentazione dell'intero genoma. Le mappe fisiche forniscono l'impalcatura su cui si possono collocare marcatori polimorfici non ancora annotati, o marcatori molecolari mappati mediante analisi genetiche. Le mappe ottenute in questo modo sono uno strumento molto utile per il sequenziamento dei genomi vegetali, rappresentando il primo passo per l'ottenimento della sequenza genomica completa.

L'inizio dell'era genomica è stata segnata nel 1995 dalla pubblicazione del primo genoma procariotico (*Haemophilus influenzae*). A partire da quella data molti altri genomi procariotici ed eucariotici sono stati sequenziati, pubblicati e utilizzati in numerosi studi molecolari e bioinformatici. In pianta il primo genoma ad essere stato sequenziato è stato quello dell'organismo modello *Arabidopsis thaliana* nel 2000. Tali dati di sequenza, insieme ai dati relativi alle mappe genetiche, consentono di identificare i geni e le caratteristiche strutturali del genoma, velocizzando notevolmente gli approcci di miglioramento genetico. Nell'ultimo decennio le tecnologie di sequenziamento hanno avuto un nuovo impulso, sostituendo i metodi tradizionali basati sul sistema Sanger, con metodi di sequenziamento più facili, economici e rapidi come i *Next Generation Sequencing* (NGS) ad *high-throughput*, come il 454 della ROCHE e l'Illumina/Solexa. E' anche da attribuire a tali avanzamenti tecnologici la crescita esponenziale che si è osservata negli ultimi anni nella pubblicazione di sequenze nelle banche dati disponibili *on-line* (figura 1.4). La disponibilità di tutte queste informazioni di sequenza, sarà fondamentale per la corretta comprensione ed analisi degli organismi viventi.

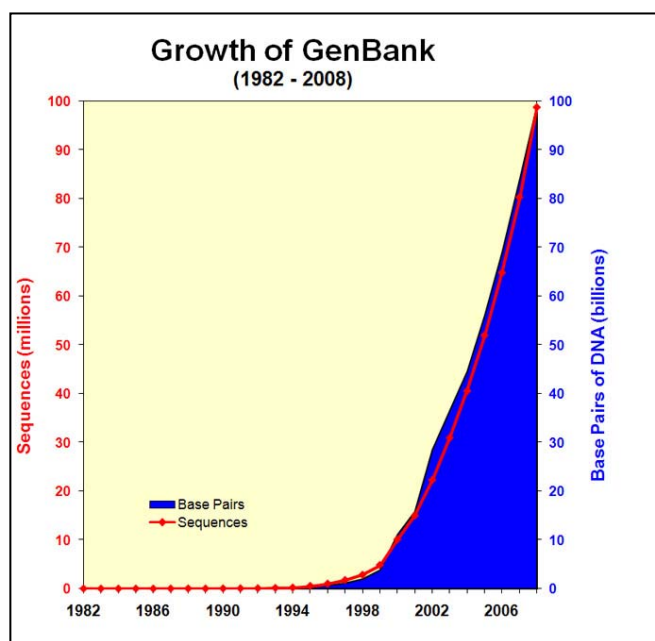


Figura 1.4: Rappresentazione dell'aumento nel numero di sequenze geniche (linea rossa) e di coppie di basi (blu) pubblicate dal 1982 al 2008.

1.4.2 Genomica funzionale

L'attuale disponibilità di sequenza di numerosi genomi ha posto le basi per l'inizio di studi dei genomi su larga scala, concentrando l'attenzione sull'identificazione di nuovi geni che aumentino le possibilità di miglioramento genetico e sul funzionamento genico al fine di comprendere in modo approfondito le funzioni biologiche degli organismi (Zelenin et al., 2001).

La genomica funzionale racchiude tutte le ricerche che hanno come scopo la comprensione della regolazione genica e di come i geni con proteine e metaboliti determinano i caratteri. Pertanto può essere intesa come il processo di assegnazione di una funzione biochimica, fisiologica e di sviluppo a ciascun gene, nonché come il processo di comprensione del ruolo genico nelle vie metaboliche (Barone et al., 2008). Si interessa dell'analisi del trascrittoma, del proteoma e del metaboloma. L'integrazione delle tre discipline consente di avere una visione d'insieme della fisiologia di un organismo.

Per trascrittoma si intende l'insieme dei trascritti di un dato organismo; essi variano a seconda della cellula, del tessuto o dello stadio di sviluppo, degli stimoli fisiologici, ambientali e di accrescimento. Per migliorare la comprensione di quanto fanno i geni e di come funzionano gli organismi è importante monitorarne i livelli di trascrizione in risposta agli stimoli forniti. Le analisi microarray sono diventate tra le più usate per lo studio

contemporaneo dell'espressione di più geni, e sono spesso associate alle analisi delle sequenze espresse (EST) disponibili in rete. Per proteoma si intende l'insieme delle proteine presenti in una particolare cellula o tessuto di un organismo in un determinato momento. Il proteoma varia sia con le modifiche post-traduzionali sia a seguito di stimoli fisiologici e ambientali. Pertanto la proteomica si interessa dello studio, della struttura, dell'espressione e dell'interazione tra le proteine, attraverso strumenti cromatografici, elettroforetici, spettrometrici, computazionali ecc. Per metaboloma, infine, si intende l'insieme dei metaboliti di un organismo. Lo studio dei profili metabolici attraverso la spettroscopia è utile per comprendere come i processi metabolici regolano l'espressione genica e capire la fisiologia cellulare in un determinato istante.

Uno degli strumenti fondamentali di genomica funzionale è rappresentato senza dubbio dalla generazione e analisi delle mutazioni, in quanto per poter risalire alla funzione di un determinato gene o dominio proteico è importante identificare mutazioni che influenzino l'attività di uno o più geni (Gibson, 2004). I tre metodi fondamentali per generare mutazioni sono rappresentati i) dalla "genetica diretta", che si riferisce alla mutagenesi casuale dell'intero genoma seguita dal mappaggio e localizzazione del gene mutato che influenza il carattere; ii) dalla "genetica inversa", che si riferisce alla mutagenesi mirata in una sequenza di DNA che interessa un gene di cui si va a studiare il fenotipo; e iii) dalla "genetica della struttura fine", che va a modificare la struttura e regolazione di uno specifico gene in modo da identificare nuove funzioni ed interazioni scaturite dall'analisi *vitro-vivo*.

L'avanzamento delle conoscenze nelle aree di ricerca -omiche è divenuto essenziale per la comprensione della funzione dei geni in associazione con i cambiamenti fenotipici e fisiologici di un organismo. Le tecnologie che integrano dati relativi al trascrittoma, proteoma e metaboloma e i database disponibili sono risorse utili per il corretto e mirato disegno di organismi vegetali migliorati in risposta ai cambiamenti climatici e all'aumento demografico, che richiede rese produttive maggiori e organismi più resistenti alle varie tipologie di stress ambientali.

Il progresso tecnologico ha portato, inoltre, allo sviluppo di nuovi strumenti altamente automatizzati tra cui quelli di bioinformatica che, grazie a software e sistemi applicativi, consentono di catalogare e velocizzare le indagini su numerosi dati biologici. Questi ultimi sono relativi non solo a sequenze ma anche a funzioni e strutture delle stesse. Le annotazioni di geni e proteine sono presenti in vari database disponibili on-line, che divengono così fondamentali per la comprensione della funzione di un organismo. Le piattaforme bioinformatiche e i database ad esse associate consentono, inoltre, il disegno mirato degli

approcci molecolari e di miglioramento genetico che puntano all'utilizzo delle risorse genomiche disponibili in rete (Mochida e Shinozaki, 2010). Le risorse genomiche così disponibili e l'aumento delle conoscenze sulle mappe molecolari possono accelerare notevolmente l'isolamento e l'utilizzo di geni associati a caratteri agronomicamente importanti da utilizzare nel miglioramento genetico.

1.4.3 Genomica comparativa

La genomica comparativa analizza come la selezione ha agito su differenze e somiglianze presenti tra DNA, RNA, proteine e regioni regolatorie tra organismi diversi. E' utile per studiare l'evoluzione dei genomi ma anche per comprendere l'organizzazione strutturale e funzionale di genomi ancora inesplorati, come quelli delle specie selvatiche per i quali ancora non sono disponibili risorse genomiche. Essa si basa essenzialmente sul paragone di genomi poco conosciuti a genomi di specie coltivate vicine, per i quali sono disponibili mappe genetiche, fisiche o sequenze genomiche (Gibson et al., 2004). Dal paragone della struttura e funzione del genoma tra le diverse specie è possibile trarre informazioni utili alla comprensione dei processi evolutivi che hanno agito sui genomi durante l'evoluzione delle specie più moderne. Le *Solanaceae* rappresentano la prima famiglia di piante a fiore per cui sono presenti studi di genomica comparativa. Quelli tra pomodoro e patata ad esempio, hanno mostrato che i due genomi differiscono solo per cinque inversioni paracentriche (Tanksely et al., 1992). E' proprio grazie agli strumenti messi a disposizione dalla bioinformatica e alla disponibilità di mappe genetiche, fisiche e sequenze geniche o genomiche che la genomica comparativa si sta diffondendo sempre più, per la comprensione della struttura genomica, per l'analisi dell'espressione genica e per una più efficiente applicazione delle metodologie di miglioramento genetico.

1.5 Miglioramento genetico molecolare

I principi scientifici di Darwin su mutazioni e selezione, nonché le idee di associazione tra fenotipo e genotipo di Mendel, hanno posto le basi per il miglioramento genetico e la genetica del ventesimo secolo. Analogamente, i recenti avanzamenti avvenuti in campo biotecnologico, bioinformatico, della biologia molecolare e della genetica, della ricerca genomica, della citogenetica, e l'integrazione con i metodi di miglioramento genetico vegetale, hanno definito i nuovi strumenti per la creazione, l'analisi e la manipolazione della variabilità

genetica e per lo sviluppo di colture migliorate. Tali avanzamenti tecnologici hanno inoltre posto le basi per il *breeding molecolare*, una scienza interdisciplinare che ha rivoluzionato il modo di migliorare le colture nel ventunesimo secolo (Moose e Mumm, 2008), tanto da diventare oggi una componente essenziale del miglioramento genetico.

Il miglioramento genetico vegetale è finalizzato alla creazione e selezione di un fenotipo superiore, che consenta lo sviluppo di cultivar migliorate nella resa, nei valori nutrizionali, o in altri caratteri d'interesse commerciale. Le innovazioni nel campo della biologia e della genetica, da molto tempo forniscono un valore aggiunto agli approcci di miglioramento genetico. Secondo alcuni il primo esempio di biotecnologia applicata al miglioramento delle varietà è dato proprio dalla domesticazione. La commercializzazione, inoltre, delle prime colture transgeniche, avvenuta nel 1996, è una dimostrazione dell'integrazione tra le biotecnologie e il *breeding*. Negli ultimi anni lo sviluppo delle varie pratiche biotecnologiche, ha fornito gli strumenti utili per la manipolazione della variazione genetica e per lo sviluppo di cultivar migliorate attraverso il miglioramento genetico molecolare, che è sempre più influenzato dalle informazioni molecolari e dell'ingegneria genetica, divenendo un'applicazione di ampio uso in molte colture. La caratterizzazione attraverso i marcatori molecolari e le conoscenze genomiche, elementi distintivi del *breeding molecolare*, hanno inoltre contribuito, alla selezione e allo studio di genotipi migliorati (Moose e Mumm, 2008).

La figura 1.5, riportata nel lavoro di Moose e Mumm (2008), riassume i metodi di selezione che ad oggi sono comunemente impiegati nei programmi di miglioramento genetico classico. A seconda del fine perseguito, è possibile utilizzare approcci metodologici differenti. Ad esempio, quando il miglioratore è interessato all'ottenimento di un genotipo contenente un carattere d'interesse, controllato da uno o pochi loci, usa il reincrocio per introgredire un singolo allele (figura 1.5 A) o il pyramidaggio genico per introgredire più alleli (figura 1.5 B). Qualora il miglioratore sia interessato a caratteri geneticamente complessi, è necessario produrre nuove combinazioni geniche nella progenie. Ciò è possibile attraverso il metodo pedigree, che prevede incroci e ricombinazione tra parentali che abbiano caratteri complementari e la selezione nella progenie segregante che possiede performance migliorate (figura 1.5 C). La selezione ricorrente, invece, prevede l'aumento contemporaneo nella frequenza di alleli favorevoli a loci multipli, attraverso l'interincrocio degli individui selezionati e cicli ripetuti di selezione (figura 1.5 D). L'efficienza dei metodi di miglioramento genetico classico descritti potrebbe essere fortemente migliorata e velocizzata se, per il trasferimento dei geni d'interesse e per la selezione degli stessi, si potesse ricorrere all'uso di

marcatori molecolari associati ai geni d'interesse. L'utilizzo dei marcatori molecolari renderebbe, pertanto, la procedura di miglioramento più rapida ed economica.

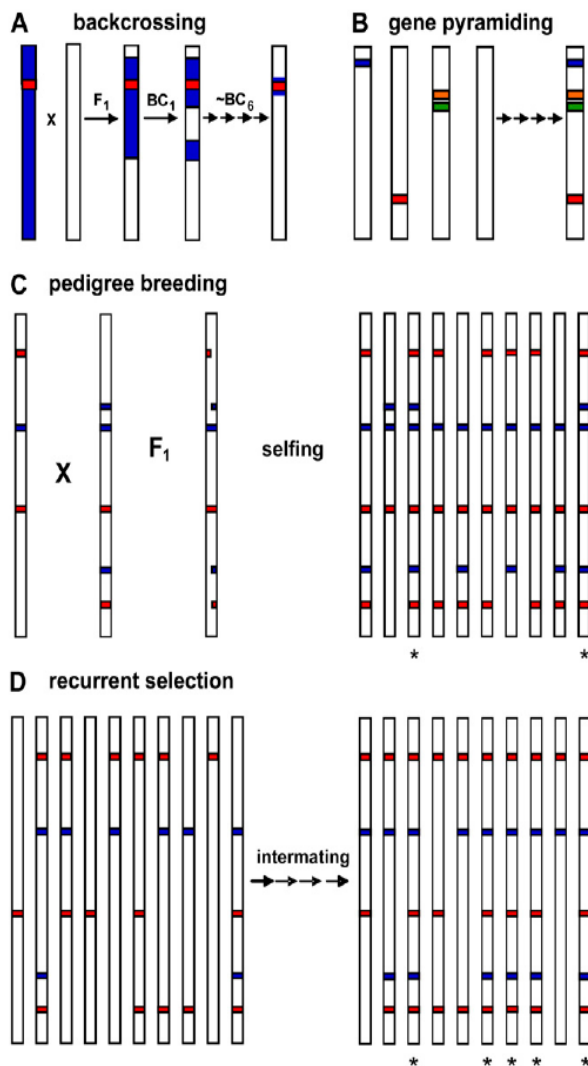


Figura 1.5: Programmi classici di miglioramento genetico e selezione. I segmenti colorati (blu e rosso) indicano geni e/o QTL all'interno dei genomi (barre verticali). Le X indicano gli incroci, le frecce indicano incroci successivi dello stesso tipo, gli asterischi indicano individui con il genotipo desiderato. In A è riportato il reintrogresso del genitore donatore (blu) contenente il gene d'interesse (rosso), con la varietà da migliorare (bianco) che porta all'ottenimento di organismi con gran parte del genoma del genitore ricorrente (bianco) più gli alleli d'interesse del donatore. In B è riportato il piramidaggio genico. Attraverso incroci e selezione nello stesso genotipo vengono combinati geni/QTL associati a differenti caratteri d'interesse (blu, rosso, arancione, verde). In C è riportato il metodo pedigree. L'autoimpollinazione della F_1 è necessaria per fissare la nuova combinazione di genotipi migliorata. In D è riportata la selezione ricorrente in una popolazione di 10 individui che segrega per due caratteri (rosso e blu). Nessun individuo della popolazione iniziale ha tutti gli alleli favorevoli ma dopo la selezione ricorrente metà della popolazione possiede il genotipo desiderato. (Moose e Mumm, 2008).

Alla luce di quanto detto, è facile comprendere come l'uso degli strumenti di genomica, affiancati ai metodi di *breeding* descritti, consentano di velocizzare e rendere più semplici gli approcci di miglioramento, nonché di selezione, delle specie vegetali. Il crescente utilizzo delle biotecnologie e dei marcatori molecolari, elementi distintivi del *breeding* molecolare, contribuiranno positivamente, all'aumento della resa produttiva di numerose colture vegetali. Così come mostrano le previsioni fatte da Edgerton, (2009) per la produzione di grano negli Stati Uniti d'America (figura 1.6). Tali previsioni sottolineano che nei prossimi venti anni, la parte preminente dell'aumento della resa, sarà data soprattutto dal contributo delle

biotecnologie e del *breeding* assistito da marcatori molecolari. Potrà essere quindi attribuita al *breeding* molecolare, la facilità di sopperimento della crescente domanda di cibo e combustibile vegetale in tutto il mondo.

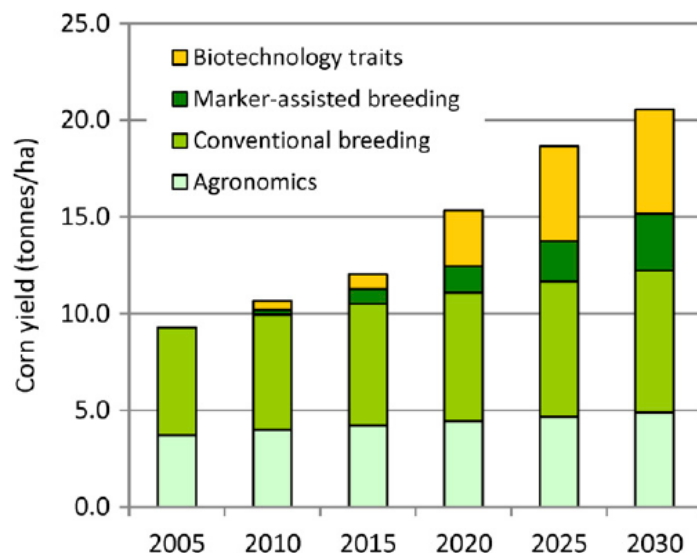


Figura 1.6: Previsione dell’impatto delle biotecnologie (giallo), del miglioramento genetico assistito dai marcatori molecolari (verde scuro), del miglioramento genetico classico (verde chiaro), e delle tecniche agronomiche (azzurro), sulla resa (espressa in tonnellate per ettaro) del grano negli USA. E’ evidente come nel tempo i primi due parametri influenzeranno positivamente le produzioni in maniera maggiore rispetto agli altri (Edgerton, 2009).

L’utilizzo dei marcatori molecolari nonché delle mappe di linkage, ha non solo condotto al concetto di *breeding* molecolare ma anche a quello di *Breeding by Design*, che rappresenta un’ulteriore estensione dell’uso dei marcatori molecolari e della mappatura genetica nel *breeding* moderno. Il concetto di *breeding by design* è incentrato sulla capacità di disegnare un genotipo superiore “*in silico*”, sulla base della comprensione delle basi genetiche dei caratteri agronomicamente importanti e della variazione allelica di questi loci. E’ possibile conseguire questo obiettivo mediante la mappatura dei loci coinvolti nei tratti agronomicamente rilevanti, la valutazione della variazione allelica a questi loci e, infine, il disegno di un genotipo superiore avente la combinazione degli alleli favorevoli a tutti i loci. Il tutto grazie al fatto che la posizione degli stessi è mappata precisamente e che gli eventi di ricombinazione sono selezionati in maniera accurata, grazie ai marcatori associati al locus d’interesse. Nella figura 1.7, tratta dal lavoro di Peleman e van der Voort (2003), sono riassunti i principi del *Breeding by Design*. L’ausilio degli strumenti informatici, inoltre, consente di determinare con precisione il percorso da seguire per l’ottenimento del genotipo desiderato, programmando in maniera mirata gli incroci e i marcatori da utilizzare per la selezione dei

ricombinanti, che racchiudono tutti gli alleli d'interesse. Data l'estrema precisione e accuratezza del processo, la selezione fenotipica non viene effettuata. Solo alla fine, ottenuta la varietà desiderata, si procede con le valutazioni fenotipiche e di resa in campo. Quindi, il *Breeding by Design*, l'integrazione degli strumenti tecnologici e delle risorse genetiche disponibili, può condurre allo sviluppo mirato di una varietà superiore.

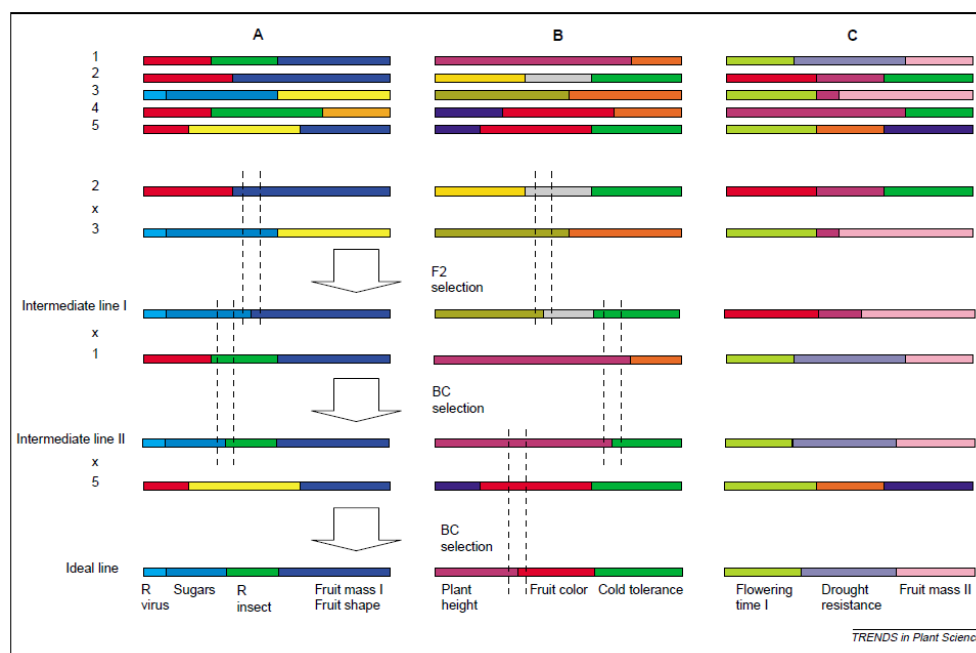


Figura 1.7: Principi del *Breeding by Design*. Selezioni successive di reincrocio (BC) e autoincrocio (F2) usando marcatori che conducono al genotipo superiore desiderato. In A, B e C sono rappresentati tre cromosomi di cinque linee parentali (1-5). I diversi colori indicano i diversi caratteri d'interesse. Le linee tratteggiate indicano la posizione dei marcatori usati per selezionare i ricombinanti desiderati. Sul fondo della figura è rappresentata la composizione genomica dei genotipi ideali, riportando ipotetici tratti di resistenza (R) e tratti associati alla qualità (Peleman e van der Voort, 2003).

Alla luce di tutti questi strumenti genomici, oggi più che mai è sentita l'esigenza di mettere a punto sistemi di analisi genomica sempre più efficienti che permettano di ottimizzare i tempi, abbassare i costi e creare risorse genetiche disponibili alla comunità scientifica internazionale. Tali nuovi strumenti consentiranno non solo di caratterizzare e utilizzare più rapidamente la variabilità genetica già esistente nell'ambito delle specie, ma di creare nuova variabilità genetica, avendo accesso a caratteri altrimenti non accessibili con i metodi classici.

1.6 Obiettivi della tesi

L'uso dell'enorme biodiversità presente nell'ambito delle specie selvatiche di patata, nonché l'applicazione delle tecnologie automatizzate e dei marcatori molecolari nel miglioramento genetico, non solo garantiscono un miglioramento nei processi di selezione, ma contribuiscono anche alla creazione di nuova variabilità genetica.

La patata rappresenta la terza coltura più importante per l'alimentazione umana, ma è un classico esempio di coltura mancante di variabilità genetica, in quanto le varietà coltivate derivano da un numero ristretto di genotipi. Molti degli studi sono orientati, perciò, ad un'efficiente utilizzazione delle risorse genetiche, al fine di ampliare la base genetica della patata coltivata. Nonostante i numerosi caratteri d'interesse ascritti a specie selvatiche, ecotipi, varietà locali ecc., però, non è sempre possibile utilizzare i metodi classici di miglioramento genetico, che prevedono tempi lunghi per la selezione e metodologie laboriose per il loro utilizzo. I nuovi strumenti basati sulla genomica strutturale e funzionale si stanno rivelando utilissimi per una più adeguata ed efficiente valorizzazione di questo patrimonio genetico, che è spesso sottoutilizzato.

Il lavoro sperimentale effettuato in questo dottorato si inserisce in programmi di ricerca svolti presso il Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta, dell'Ambiente e delle Produzioni Animali (DiSSPAPA) finalizzati alla salvaguardia, alla valorizzazione, allo studio e alla utilizzazione di germoplasma selvatico di patata, con particolare attenzione allo sviluppo di nuovi strumenti genomici applicabili al miglioramento genetico della patata.

Il lavoro svolto si è incentrato sulla disponibilità di materiale vegetale costituito da specie selvatiche, varietà coltivate e ibridi interspecifici di patata. Le prime due sono state utilizzate in analisi finalizzate all'identificazione di caratteri di resistenza a stress biotici, nonché allo sviluppo di strumenti genomici da utilizzare in schemi di miglioramento genetico; gli ibridi interspecifici, invece, sono stati utilizzati per lo sviluppo di una strategia di valutazione del dosaggio cromosomico.

Nello specifico, gli obiettivi del lavoro sperimentale effettuato possono essere riassunti come segue:

1. analisi molecolare e fenotipica delle specie selvatiche disponibili nella banca di germoplasma del DiSSPAPA, per l'individuazione di genotipi resistenti a stress biotici (*Ralstonia solanacearum* e virus Y), da introgredire nella specie coltivata. È stato effettuato un accurato *fingerprinting* molecolare di specie selvatiche e varietà coltivate tramite l'uso di marcatori molecolari SSR e sono stati identificati alleli specifici utili

per la selezione assistita e per la definizione delle combinazioni di incrocio interspecifiche più adatte;

2. analisi bioinformatica dei marcatori molecolari DArT costituenti le mappe di associazione genetica, disponibili presso il DiSSPAPA nei confronti delle specie selvatiche *S. commersonii* e *S. bulbocastanum*. Questo lavoro, effettuato attraverso l'allineamento dei marcatori alle sequenze genomiche di patata e pomodoro, ha consentito la valutazione della qualità e della distribuzione cromosomica degli allineamenti, l'identificazione di marcatori associati a geni di resistenza e marcatori specifici delle specie selvatiche, nonché lo studio della sintonia tra i genomi di patata e pomodoro;
3. identificazione di marcatori molecolari COSII *S. commersonii*-specifici in genotipi ibridi già disponibili presso il DiSSPAPA e messa a punto di un protocollo basato sull'uso della tecnica *High Resolution Melting* (HRM) per definire il dosaggio cromosomico di ibridi ipotriploidi tra *S. commersonii* e *S. tuberosum*.

Capitolo 2

2.1 Introduzione

2.1.1 Le specie selvatiche di patata e gli strumenti genomici

La patata coltivata è suscettibile a un numero considerevole di patogeni inclusi batteri, virus, funghi, nematodi e insetti; essi comportano una riduzione notevole della produzione e, di conseguenza, le rese produttive spesso dipendono dall'utilizzo di un grosso ammontare di pesticidi (Vleeshouwers et al., 2011).

Nel germoplasma selvatico del genere *Solanum* è possibile reperire geni utili per la costituzione di nuove varietà aventi caratteristiche migliorate. Da molto tempo, pertanto, l'interesse di un numero considerevole di genetisti e miglioratori è rivolto all'efficiente uso delle specie selvatiche. La sezione *Petota* del genere *Solanum* comprende, oltre alla patata coltivata *S. tuberosum*, più di 200 specie selvatiche che rappresentano il più ampio e ricco germoplasma del regno vegetale (Thieme et al., 2010). Le specie produttrici di tuberi che appartengono a tale sezione hanno un livello di ploidia variabile dal diploide ($2n=2x=24$) all'esaploide ($2n=6x=72$); presentano, inoltre, un'ampia distribuzione geografica che va dal sud degli Stati Uniti al sud del Cile, adattandosi a un ventaglio di condizioni ambientali considerevole (Bradshaw et al., 2006). Ne sono un esempio *S. acaule* Bitter, che cresce nelle Ande sopra i 4500 m e spesso è sottoposta ad eventi di gelo, oppure *S. berthaultii* Hawkes e *S. tarijense* Hawkes che crescono nelle condizioni di clima secco e semi-arido del Messico (Aversano et al., 2007). E' anche per tale capacità di adattamento che molte specie selvatiche hanno sviluppato forti resistenze ad un ampio spettro di stress biotici, inclusi alcuni dei peggiori patogeni che affliggono la patata come la peronospora, la dorifora, taluni virus e gli agenti dei marciumi del tubero. Al contrario la patata coltivata che si è evoluta in condizioni ambientali molto limitate, invece, è divenuta suscettibile a numerosi stress biotici e abiotici.

Tra le specie selvatiche di patata *S. chacoense* ($2n=2x=24$, 2EBN) risulta resistente alla maggior parte delle malattie virali che colpiscono la patata (PVX, PVA, PVF, e PLRV) e alla gamba nera. *S. berthaultii* e *S. candolleanum* (entrambe $2n=2x=24$, 2EBN) sono risultate resistenti ad alcuni isolati di *Erwinia carotovora*. Fonti di resistenze alla *Leptinotarsa decemlineata* sono state ritrovate in *S. pinnatisectum* ($2n=2x=24$, 1EBN) ed in *S. tarijense*

($2n=2x=24$, 2 EBN); resistenza ai nematodi *Globodera pallida* e *G. rostochiensis* sono state evidenziate in *S. spegazzini* e *S. sparsipilum* (entrambe $2n=2x=24$, 2 EBN). In *S. stoloniferum* ($2n=2x=48$, 2 EBN) e *S. berthaultii* sono state riscontrate resistenze a *Fusarium*. In quest'ultima specie sono state riportate anche resistenze al *Myzus persicae*, alla *Phthorimaea operculella*, alla *Phytophthora infestans* e a *Verticillium*. Particolarmente interessanti sono le specie selvatiche *S. bulbocastanum* ($2n=2x=24$, 1 EBN) e *S. pinnatisectum* ($2n=2x=24$, 1 EBN), resistenti al fungo fitopatogeno *P. infestans* principale avversità della patata in termini di perdite economiche. In *S. bulbocastanum*, oltre alla resistenza a *P. infestans*, è stata riscontrata anche la resistenza a *M. persicae* e *M. euphorbiae*, *G. rostochiensis*, *Verticillium*, nonché a caldo e siccità. Altra specie selvatica di patata molto interessante è *S. commersonii* ($2n=2x=24$, 1 EBN), che reca numerose resistenze a stress biotici come *Ralstonia solanacearum*, *E. carotovora*, virus X e a stress abiotici quali freddo e siccità. Esprime anche caratteri positivi correlati ad una migliore produttività e qualità e ad un elevato contenuto in sostanza secca.

Il trasferimento di geni utili dal *gene pool* selvatico alla patata coltivata è spesso impedito dalla presenza di meccanismi di isolamento riproduttivo. La maggioranza delle specie selvatiche di patata, infatti, è sessualmente isolata dalla patata coltivata non solo a causa della differente ploidia ma anche a causa di barriere sessuali post-zigotiche, che determinano la degenerazione dell'endosperma ibrido (Camadro et al., 2004). Tali barriere di incompatibilità possono essere superate grazie a manipolazioni della ploidia, a incroci ponte, a trattamenti ormonali, al recupero degli embrioni e all'ibridazione somatica attraverso la fusione di protoplasti. Queste strategie possono consentire l'introggressione dei geni d'interesse dalle specie selvatiche alla patata coltivata.

Ai fini del miglioramento genetico, l'identificazione di fonti di resistenza e altri caratteri d'interesse agronomico è molto importante. Nonostante tutti i caratteri d'interesse presenti nell'ambito delle specie selvatiche, le varietà di metodiche disponibili per accedere a queste risorse genetiche, e il loro enorme potenziale nel risolvere le problematiche associate all'aumento della produttività, le specie selvatiche sono ancora sottoutilizzate (Pavek e Corsini, 2001); in quanto vi è la necessità di effettuare numerosi studi di “pre-breeding” per la caratterizzazione di geni e alleli utili nel miglioramento genetico (Pavek e Corsini, 2001). Infatti, solo una piccola parte del germoplasma selvatico è usato nel trasferimento di resistenze, ad esempio la resistenza alla dorifora è stata trasferita da *S. berthaultii* (Plaisted et al. 1992), o la resistenza al nematode *G. pallida* è stata trasferita da *S. vernei* e *S. sparsipilum* (Ortiz et al., 1997). Si evince quindi un'elevata disparità tra il grosso numero di specie selvatiche che mostrano caratteri promettenti e il loro utilizzo nel miglioramento genetico. Nello sviluppo di

nuove varietà i miglioratori genetici spesso non hanno abbastanza tempo o risorse per il trasferimento dei geni utili dalle specie selvatiche alla patata coltivata in quanto tale processo prevede numerosi cicli di incrocio e selezione, per eliminare i caratteri indesiderati (Pavek e Corsini, 2001). L'uso delle specie selvatiche nei programmi d'incrocio comporta spesso, infatti, l'introduzione nella nuova varietà non solo di geni utili ma anche di geni deleteri ed effetti negativi caratteristici del cosiddetto *linkage drag*. Tutte queste problematiche possono essere ridotte dall'ausilio dei marcatori molecolari che consentono di facilitare di gran lunga i processi di miglioramento, riducendo i tempi per la selezione e aumentando le possibilità di incroci efficaci. I marcatori molecolari rappresentano gli strumenti genomici più utilizzati per analizzare la variabilità genetica ottenuta e per monitorare l'introggressione di geni utili da specie selvatiche a quelle coltivate, nonché per operare una selezione assistita per i caratteri di interesse e scartare precocemente gli individui con caratteristiche negative senza influenzare i caratteri desiderati (Barone, 2004). La selezione assistita è un'applicazione molto interessante dell'uso dei marcatori genetici; infatti, aiuta i miglioratori nell'introduzione di piccoli frammenti di genoma d'interesse dalle specie selvatiche o da altre specie a quello coltivato, riducendo notevolmente i tempi per la selezione e l'incorporazione di caratteri indesiderati. In patata sono numerosi gli esempi che riportano l'uso dei marcatori molecolari. Iovene et al. (2004) hanno usato marcatori AFLP per la selezione assistita negativa di ibridi interspecifici con i caratteri d'interesse della specie selvatica ma il maggior contenuto possibile di genoma coltivato. Aversano et al. (2007) hanno impiegato i marcatori AFLP per la caratterizzazione molecolare di specie selvatiche di patata analizzate per la resistenza nei confronti di numerosi patogeni. L'uso combinato di più marcatori quali AFLP, RAPD e SSR è riportato in numerosi studi utili per l'analisi genetica di specie selvatiche di patata (Van Den Berg et al. 2002; Ghislain et al., 2006). In particolare, l'uso dei marcatori SSR in patata è stato di elezione per gli studi di biodiversità, tracciabilità, mappaggio genetico ecc (Feingold et al., 2005; Ghislain et al., 2009).

I marcatori molecolari SSR (*Simple Sequence Repeat*) sono marcatori costituiti da ripetizioni nucleotidiche in tandem da 1 a 10 basi, disperse nei genomi eucariotici sia a livello delle regioni codificanti che non codificanti e identificati mediante amplificazione PCR con *primer* fiancheggianti i motivi ripetuti (Feingold et al., 2005). Essi sono in grado di evidenziare polimorfismi nelle sequenze di DNA ripetute nel genoma. Il polimorfismo, infatti, è dato non da differenze nella sequenza del motivo base ma nel numero di volte che questo motivo viene ripetuto o nella presenza di mutazioni puntiformi all'interno del motivo stesso. Ciò consente di identificare varianti alleliche che differiscono nella lunghezza della sequenza ripetuta (Lee et

al., 2004). Si pensa che la variazione nel polimorfismo degli SSR sia dovuta ad errori della polimerasi durante la replicazione o eventi di crossing over ineguale (Innan et al., 1997).

Sono definiti perfetti i marcatori SSR che presentano la ripetizione della stessa sequenza nucleotidica n volte (ad esempio $(CA)_n$); imperfetti quelli in cui la sequenza nucleotidica ripetuta n volte è talvolta interrotta da 7-8 paia di basi casuali (ad esempio $(CA)_nGACTACG(CA)_n$); e composti se presentano due tipi di sequenze ripetute n volte e alternate (ad esempio $(CA)_n(GC)_n$).

I marcatori SSR sono codominanti, altamente polimorfici e sono ben conservati tra le specie; pertanto sono utili nell'analisi della biodiversità, nell'identificazione di cultivar e in studi filogenetici. Tra i numerosi vantaggi che presentano gli SSR vi è la semplicità d'uso e il basso costo, nonché la predisposizione all'automazione e la riproducibilità. Richiedono tuttavia l'uso di gel ad elevata risoluzione date le differenze riscontrabili anche in pochi nucleotidi (Ruiz de Galarreta et al., 2011); pertanto spesso vengono visualizzati mediante elettroforesi capillare. Un ulteriore vantaggio di questa classe di marcatori sta nella loro capacità di mettere in evidenza un'elevatissima diversità genetica, poiché i polimorfismi sono dovuti a varianti alleliche allo stesso locus, perciò sono adatti all'accurata tipizzazione genotipica e all'identificazione varietale.

La frequenza dei marcatori SSR varia dai mammiferi alle piante, con una frequenza cinque volte maggiore nei primi. Nelle piante la frequenza è di circa 1 marcatore ogni 21.2 kb per le dicotiledoni e ogni 64.6 kb per le monocotiledoni. Inizialmente questo è stato un limite ma oggi tale problema è stato altamente superato (Feingold et al., 2005), fino al loro largo impiego in numerosi studi e applicazioni. I marcatori SSR sono stati usati in studi di diversità genetica in frumento (Ma et al., 2009); in studi di popolazione in mais (Taramino e Tingey, 1996); per l'identificazione varietale e l'analisi di popolazione in pesco (Aranzana et al., 2003; Li et al., 2008). In patata sono stati utili per studi di biodiversità (Spooner et al., 2007); tracciabilità di varietale (Ghislain et al., 2009); fingerprinting molecolare (Moisan-Thiery et al., 2005); mappaggio genetico (Feingold et al., 2005); in studi di linkage disequilibrium (Stich et al., 2005) e flusso genetico (Fenart et al., 2007).

I marcatori molecolari sono strumenti genomici utilizzabili prima, dopo e durante le attività di miglioramento genetico. Per aumentare l'efficienza dei processi di miglioramento genetico, i marcatori molecolari possono essere particolarmente efficaci nella comprensione delle relazioni genetiche esistenti nell'ambito germoplasma selvatico di patata, aumentando le conoscenze genetiche utili nei programmi di *breeding*. Le analisi mediante i marcatori molecolari possono, infatti, consentire lo sviluppo di mappe genetiche e la semplice

identificazione di specifici caratteri d'interesse (Aversano et al., 2007). Per tutti questi motivi i marcatori SSR sono stati utilizzati anche nella presente attività di ricerca.

Tra le patologie che affliggono la patata, la *Ralstonia solanacearum* e il Virus Y sono considerate tra le più dannose, in quanto causano grosse perdite economiche e in termini di raccolto. Pertanto, in questa attività di ricerca, grossa attenzione è stata rivolta nei confronti di queste due patologie.

2.1.2 *Ralstonia solanacearum*

R. solanacearum, conosciuto per gran parte del ventesimo secolo come *Pseudomonas solanacearum*, è uno dei patogeni batterici vegetali più pericolosi al mondo a causa della sua aggressività, dell'ampia distribuzione geografica e dei lunghi tempi di sopravvivenza nel suolo e nell'acqua (Genin, 2010). E' un batterio gram negativo del suolo responsabile dell'avvizzimento batterico in molte colture importanti; è capace, infatti, di infettare più di 200 specie appartenenti a oltre 50 famiglie botaniche, tra cui monocotiledoni, dicotiledoni e piante annuali (Kawasaki et al., 2007). A livello mondiale è considerato uno dei più importanti patogeni vegetali in termini di perdite economiche per la patata, il pomodoro, il tabacco, l'arachide, le piante ornamentali e l'eucalipto. Nelle aree tropicali e sub-tropicali *R. solanacearum* è molto comune ed è considerato da quarantena; inoltre, negli ultimi anni sta diventando una minaccia anche in Europa, poiché alcuni ceppi si sono adattati al clima temperato (Guidot et al., 2009). Essendo un batterio in grado di sopravvivere nel suolo per lungo tempo anche senza la pianta ospite, è capace di penetrarvi tipicamente attraverso ferite radicali provocate dagli strumenti di lavorazione del terreno o da altre cause naturali. Questo batterio invade le radici delle piante e si insinua nel sistema vascolare ostruendolo e provocando l'avvizzimento e la morte delle stesse. I tipici sintomi della malattia sono rappresentati dall'imbrunimento dello xilema, dalla perdita di turgore, dall'ingiallimento e dalla caduta delle foglie e in fine dal collasso della pianta stessa (Genin, 2010).

Tradizionalmente *R. solanacearum* è stato suddiviso in 5 razze fisiologiche in riferimento all'ospite attaccato e in sei biovar sulla base di caratteristiche biochimiche e fisiologiche. Le razze 1 e 3 e i biovar 1 e 4 attaccano la patata (van der Wolf e De Boer, 2007). Razza e biovar non corrispondono, ad eccezione della razza 3 che è equivalente al biovar 2. Questi includono ceppi adattati a temperature e climi freddi e ad elevate altitudini in climi subtropicali, inoltre sono geneticamente e fenotipicamente molto omogenei. I biovar 1, 3 e 4, invece, sono raggruppati nella razza 1 e sono principalmente presenti nelle regioni tropicali;

essi sono caratterizzati da notevole diversità genetica e fenotipica nonché dall'ampia variazione nel range di ospiti. Ad esempio il biovar 1 si trova principalmente in America e Africa, mentre il biovar 3 in Asia (van der Wolf e De Boer, 2007).

R. solanacearum si presenta come una specie piuttosto eterogenea caratterizzata da molti gruppi genetici, pertanto sono stati condotti numerosi studi al fine di comprendere la diversità fenotipica e genotipica in essa presente. Di recente è stato anche proposto un nuovo schema di classificazione basato sull'analisi della sequenza nucleotidica di quattro geni marker (Fegan e Prior, 2005). Questa classificazione su base genetica offre la possibilità di effettuare una distinzione tassonomica migliore di quella basata sulle razze. In cui *R. solanacearum* viene classificata in 4 filotipi o *cluster* genici, ognuno dei quali riflette l'origine geografica del ceppo (Genin, 2010). Dal confronto con la classificazione tradizionale è emerso che il ceppo di *R. solanacearum* tradizionalmente conosciuto come razza 3 e biovar 2, responsabile dell'avvizzimento bruno in patata, corrisponde al filotipo IIB 1 (Guidot et al., 2009). Esso è altamente patogenico per pomodoro e patata e risulta molto distruttivo per quest'ultima. Questo ceppo è particolarmente pericoloso perché asintomatico e causa di un'infezione latente nei tuberi seme della patata e del geranio, tanto da essere disseminato nel mondo attraverso l'esportazione di talee o tuberi. Nell'ambito di tale lavoro di dottorato, è proprio nei confronti di tale ceppo che si è incentrata la ricerca di genotipi di resistenti.

Ad oggi non sono noti sistemi di controllo chimico efficaci nel combattere tale batterio, né sono stati identificati in patata o trasferiti geni di resistenza nei confronti di *R. solanacearum*. Di recente in *Arabidopsis thaliana* è stato clonato e caratterizzato un unico gene di resistenza nei confronti di tale patogeno, indicato come *RRS1* (Deslandes et al., 2002) e non ancora identificato in nessuna cultivar di patata. Inoltre, i livelli di resistenza nelle varietà coltivate sono molto bassi, pertanto sono necessari studi che consentano di individuare fonti di resistenza durature da introdurre nelle varietà coltivate attraverso il miglioramento genetico (Carputo et al., 2009).

2.1.3 Il Virus Y della patata

Il virus Y della patata (PVY) è la specie tipica del genere *Potyvirus* appartenente alla più grossa famiglia di virus vegetali la *Potyviridae* (Hu et al., 2009). I membri di questa famiglia sono caratterizzati da particelle filamentose senza rivestimento della lunghezza di 680-900 nm, che racchiudono un genoma a singolo filamento di RNA di polarità positiva (+ssRNA) di 9.7 kb (Rigotti e Gugerli, 2007). Il suo genoma virale codifica per una

poliproteina processata post-trascrizionalmente da tre proteasi virali in 9 prodotti genici utili per la sua replicazione (Dougherty e Carrington, 1988). Il capsido è costituito da sub-unità proteiche uguali tra di loro, di circa 330 amminoacidi, che si avvolgono intorno al filamento di RNA formando un'elica.

Il virus Y della patata attacca esclusivamente le *Solanaceae* coltivate tra cui patata, pomodoro, tabacco e peperone, alle quali causa danni notevoli (Hu et al., 2009). Ha, inoltre, una distribuzione cosmopolita ed è considerato il virus economicamente più dannoso per le colture di patata nel mondo, soprattutto in Europa, America, Asia ad eccezione dell'Australia in cui non ha mai causato danni significativi (Singh et al., 2008). Il PVY può essere trasmesso meccanicamente, ma in natura viene trasmesso in maniera non persistente da una trentina di afidi, dei quali *Myzus persicae*, *Aphis gossypii*, *A. spiraecola*, *A. fabae*, *Macrosiphum solanifolii* e *M. pisi* rappresentano i principali vettori (Rigotti e Gugerli, 2007). La trasmissibilità è favorita dalla presenza nella pianta infetta di una proteina codificata dal genoma virale definita “*helper factor*” che consente l'acquisizione di buona trasmissibilità anche a ceppi che vengono trasmessi scarsamente, se l'afide prima si alimenta su una pianta infetta. L'uso di aficidi però, non consente di prevenire in modo efficiente la trasmissione virale. Inoltre, la trasmissione del virus può avvenire anche piantando tuberi infetti (van der Wolf e De Boer, 2007).

Il PVY causa sintomi variabili, dalla quasi latenza a estesi fenomeni necrotici e morte prematura della pianta, in relazione al ceppo virale e alla varietà interessata. La sintomatologia più frequentemente è costituita da macule clorotiche e rugosità estese a tutta la foglia, contemporaneamente a necrosi delle nervature visibili nella pagina inferiore. Tutto ciò come conseguenza comporta la perdita di turgore e l'appassimento delle foglie, con assenza di sintomi particolari sui tuberi delle patate che a volte si presentano di taglia inferiore e disformi.

Tradizionalmente il PVY viene classificato in tre ceppi principali sulla base della trasmissibilità e dei sintomi indotti su alcune piante indicatrici di patata e di tabacco (Blanco-Urgoiti et al., 1998). Il ceppo PVY^O, noto come ceppo ordinario o comune, causa severi sintomi sistemici a mosaico ed è diffuso in tutto il mondo; il ceppo PVY^N, identificato come ceppo della necrosi nervale in tabacco, induce necrosi sistemica nervale in tabacco e in quasi tutte le cultivar di patata (Hu et al., 2009) ed è riportato principalmente in America, Europa, Africa e Nuova Zelanda; il ceppo PVY^C è definito della striatura punteggiata della patata e oltre che nei paesi riportati per il PVY^N è stato identificato anche in Australia orientale. Negli ultimi decenni sono emersi nuovi ceppi come il ceppo PVY^Z, così classificato perché per la sintomatologia provocata non rientrava né nel ceppo PVY^C né in quello PVY^O, oppure il ceppo

PVY^E che presenta sintomatologie simili agli altri (Karasev et al., 2010). Con il passare del tempo nel ceppo PVY^N sono stati individuati i sottogruppi PVY^{NTN} e PVY^{N-Wi} (Le Romancer et al., 1994; Glais et al., 2005). Entrambi possono causare sintomi particolarmente gravi, che si presentano come macule anulari necrotiche dei tuberi (PTNRD) tali da renderli incommerciabili, inoltre, in essi sono riscontrabili isolati ricombinanti tra PVY^O e PVY^N (Rigotti e Gugerli, 2007).

In patata esistono due tipi di resistenza al PVY, una indicata come resistenza estrema (ER) e l'altra come resistenza di ipersensibilità (HR). La prima protegge la patata contro tutti i ceppi di PVY, impedendo l'accumulo del virus nelle cellule infette e non da sintomi visibili. La seconda, invece, è una resistenza ceppo specifica caratterizzata dallo sviluppo di aree necrotiche in cui le cellule del sito iniziale di inoculo o di infezione vanno incontro a morte, prevenendo la diffusione del virus al resto della pianta. Il meccanismo molecolare responsabile di tale resistenza è sconosciuto ed è noto che la stessa può variare a seconda della temperatura (Vidal et al., 2002). Un esempio di resistenza di ipersensibilità è quella conferita dal gene *Ny* nei confronti del ceppo PVY^O (Jones, 1990). In una regione ricca di geni di resistenza presente sul cromosoma 11 di patata (Gebhardt e Valkonen, 2001), sintenica a quella individuata su tabacco, è stato individuato il gene *Ry_{adg}* (in *S. tuberosum* subsp. *andigena*) e il gene *Ry_{sto}* in (*S. stoloniferum*) che conferiscono resistenza estrema a PVY (Vidal et al., 2002; Thieme et al., 2010).

2.1.4 Obiettivi

Numerosi patogeni e talune avversità climatiche comportano perdite notevoli nella resa annuale dei raccolti di patata. La disponibilità di un'ampia variabilità genetica è, quindi, fondamentale per la difesa e la protezione nei confronti dell'evoluzione dei patogeni responsabili di malattie e dei drastici cambiamenti climatici. Tutto ciò è ancora più importante per tutte quelle specie come *S. tuberosum*, altamente eterozigoti e che pertanto traggono beneficio dall'effetto eterotico (Pavek e Corsini, 2001).

Le specie selvatiche di patata sono una fonte di geni utili per il miglioramento genetico ma sono sottoutilizzate, soprattutto a causa della lunghezza e della laboriosità dei metodi tradizionali necessari per operare la selezione e per eliminare i caratteri indesiderati provenienti dalle stesse (Pavek e Corsini, 2001). Con l'avvento dei marcatori molecolari, però, tali limiti possono essere notevolmente superati. Tra i miglioratori nasce sempre più l'esigenza di individuare nuove fonti di resistenza nel così poco caratterizzato germoplasma selvatico e di

sviluppare marcatori molecolari che aumentino le conoscenze genetiche ad esse associate e ne consentano un più rapido sfruttamento.

E' in tale contesto che gli obiettivi dell'attività di ricerca riportata in questo capitolo puntano innanzitutto all'individuazione di fonti di resistenza a stress biotici, in particolare nei confronti della *R. solanacearum* e del virus Y, da introgredire nella specie coltivata.

Mediante l'analisi molecolare e fenotipica delle specie selvatiche disponibili presso il DiSSPAPA è stato possibile individuare resistenze multiple in alcune delle specie selvatiche analizzate. Successivamente la ricerca ha previsto l'analisi genotipica mediante marcatori SSR delle specie selvatiche e di varietà coltivate al fine di identificare alleli specie-specifici per tutte le specie selvatiche utili nei programmi di selezione assistita negativa e di valutare le relazioni filogenetiche esistenti tra le specie selvatiche e le varietà analizzate.

2.2 Materiali e Metodi

2.2.1 Materiale vegetale

Lo studio volto all'individuazione di fonti di resistenza nei confronti di *Ralstonia solanacearum* e Virus Y, è stato condotto sul materiale vegetale costituito da 21 cloni appartenenti a 12 specie selvatiche riportati in tabella 2.1.

Tabella 2.1 Elenco delle specie selvatiche di patata utilizzate nelle analisi fenotipiche e molecolari per individuare resistenze a stress biotici. Per ogni specie sono riportati da uno o tre cloni per i quali viene indicato il numero di accessione, la ploidia, l'EBN e l'origine. Il segno (-) indica l'assenza del dato.

Specie selvatica	Clone	Accessione (nro)	Ploidia 2n	EBN	Origine
<i>Solanum acaule</i>	ACL1B	210029	48	2	Bolivia
	ACL1C	210029	48	2	Bolivia
<i>Solanum bulbocastanum</i>	BLB1C	275190	24	1	Messico
	BLB2C	275188	24	1	Messico
	PT29	243510	24	1	Messico
<i>Solanum cananense</i>	CAN1B	365321	24	2	Perù
<i>Solanum cardiophyllum</i>	CPH2A	347759	24	1	Perù
	CPH1C	283062	24	1	Messico
<i>Solanum chacoense</i>	CHC1A	133124	24	2	Messico
	CHC1B	275141	24	2	Messico
<i>Solanum commersonii</i>	CMM1T	243503	24	1	Uruguay
	CMM6-6	590886	24	1	Uruguay
<i>Solanum etuberosum</i>	ETB3	558054	24	1	Messico
<i>Solanum fendleri</i>	FEN1B	275165	48	2	USA
	FEN2B	458417	48	2	Cile
<i>Solanum multidissectum</i>	MLT1A	-	24	2	USA
<i>Solanum phureja</i>	IVP35	584995	24	2	Colombia
	IVP101	584993	24	2	Colombia
<i>Solanum stoloniferum</i>	STO1A	275248	48	2	Colombia
	STO1C	275248	48	2	Colombia
<i>Solanum tarijense</i>	TAR2B	414148	24	2	Argentina

Nello studio molecolare condotto mediante marcatori SSR sono state usate le specie selvatiche riportate in tabella 2.1 e 24 varietà coltivate di *S. tuberosum* con ploidia 2n e riportate di seguito:

Blondy, Elfe, Vivaldi, Marabel, Bartina, Dayana, Terragold, Primura, Asterix, Volumia, Veronie, Arrow, Selezione Raf, Sieglinde, Spunta, Elvira, Frisia, Antea, Liseta, Arinda, Inova, Agria, Agata, Badia.

Il materiale vegetale utilizzato negli studi riportati in questo capitolo era già disponibile presso la banca di germoplasma della Sezione di Genetica Agraria del DiSSPAPA dell'Università degli Studi di Napoli Federico II.

Tale materiale è stato prelevato da uno stock genetico conservato *in vitro* in camera di crescita a 7°C, su substrato solido contenente sali di MS (Murashige e Skoog, 1962), ottenuto mediante l'aggiunta di 10 gl-1 di saccarosio, 8 gl-1 di agar e avente un ph 5.8. Diversi cicli di micropropagazione *in vitro* su substrato artificiale MS includente 30 gl-1 di saccarosio sono stati necessari per ottenere un numero sufficiente di piantine da utilizzare nelle analisi molecolari e di resistenza programmate.

2.2.2 Saggio di sensibilità a *Ralstonia solanacearum*

Per i test di sensibilità al fitopatogeno *R. solanacearum* è stato usato il ceppo di *R. solanacearum* SA93, isolato da patata ed appartenente alla razza 3, biovar 2. Il lavoro è stato svolto in collaborazione con il prof. A. Zoina, del dipartimento di Arboricoltura, Botanica e Patologia Vegetale, della facoltà di Agraria dell'Università degli Studi di Napoli Federico II. Per ogni clone selvatico sono stati condotti due test, utili per la validazione dei risultati. Per ogni test, e per ogni clone sono state utilizzate 10 *vitro*-piante di quattro settimane, acclimatate in camera di crescita e successivamente trasferite in serra. Al raggiungimento di otto-undici foglie (13-15 cm di altezza), otto piantine per genotipo sono state inoculate con la sospensione batterica; le rimanenti due piantine sono state inoculate con acqua sterile e utilizzate come controllo. Le singole piantine, allevate in vasetti con terriccio sterile, sono state poggiate su supporti e posizionate all'interno di ampi contenitori di plastica recanti un sottile strato di acqua sufficiente a mantenere le giuste condizioni di umidità necessarie allo sviluppo del patogeno. L'inoculo è stato effettuato praticando ferite alle radici e somministrando ad ogni piantina 2 ml di una sospensione del batterio (5×10^7 ufc/ml). Le piantine sono state collocate in una camera di crescita a 16 ore di luce e 8 di buio, 20°C e luminosità 16000 lux.

Il rilievo dell'incidenza della malattia è stato effettuato a 6, 9, 12, 15, 18 e 20 giorni dall'inoculo. Ad ogni pianta è stato attribuito un indice di malattia da 0 a 4 (Carputo et al., 2009), come riportato in figura 2.1. A seconda della gravità dei sintomi rilevati sono stati attribuiti i valori degli indici di malattia come riportato di seguito:

- 0 = pianta sana
- 1 = percentuale foglie infette <25%
- 2 = percentuale foglie infette >25% e <50%
- 3 = percentuale foglie infette >50% e <75%
- 4 = pianta morta.

Per ognuno dei genotipi testati, ad ogni rilievo, è stato calcolato l'indice medio di malattia indicato con la sigla IM. Sono state considerate resistenti piante con un IM minore di 1, mediamente resistenti quelle con un indice IM compreso tra 1 e 2.5, suscettibili le altre.



Figura 2.1: Indice di malattia in scala da 0 a 4 per i test di sensibilità condotti nei confronti del fitopatogeno vegetale *R. solanacearum*.

A 15 e 31 giorni dall'inoculo una piantina per ogni genotipo è stata prelevata e sottoposta a saggi di piastratura su terreno selettivo e ad analisi molecolari. L'isolamento del batterio e del suo genoma è stato effettuato dalla porzione radicale e apicale delle piantine prelevate. Le stesse sono state opportunamente lavate e sterilizzate in una soluzione contenente candeggina 1% per 15 minuti. In seguito la parte ipogea e la porzione apicale sono state macerate in presenza di soluzione fisiologica di 8 gr/l di NaCl (3 ml in 200 mg). Per valutare la presenza delle colonie batteriche nelle due porzioni, 10 µl del succo vegetale così ottenuto sono stati piastrati su substrato selettivo SMSA (Elphistone et al., 1996) ed incubati a 25°C per 72 ore. La parte restante del succo vegetale è stato sottoposto ad estrazione del DNA per le analisi molecolari.

2.2.3 Analisi molecolari per individuare la resistenza a *R. solanacearum*

Il succo vegetale ottenuto dalle porzioni apicali e radicali, è stato sottoposto ad estrazione del DNA mediante il protocollo proposto da Llop et al. (1999). Il protocollo di estrazione, per 500 µl del succo vegetale, ha previsto l'utilizzo di una soluzione di estrazione costituita da Tris HCl 200 mM pH 7.5, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, SDS 0.5%, PVP 2% e dell'isopropanolo per la precipitazione del DNA che è stato risospeso in acqua distillata. Il DNA ottenuto è stato quantificato con lo spettrofotometro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, LLC, Wilmington, DE) e conservato a -20°C. La qualità del DNA estratto è stata valutata mediante visualizzazione al trans illuminatore GelDocXR su gel di agarosio all'1.5%.

Il DNA è stato sottoposto ad amplificazione PCR seguendo le indicazioni consigliate dalla Direttiva Europea. Le condizioni di amplificazione utilizzate sono state allestite in una miscela di reazione di 25 µl di volume finale contenente 30 ng di DNA, Buffer PCR (1X) (1.5 mM MgCl₂); dNTPs (0.2 mM); taq-polimerasi (0.5 U); *primer Forward* OLI-1 e *primer Reverse* Y-2 alla concentrazione di 1 µM. Il ciclo PCR utilizzato ha previsto un'incubazione a 96°C per 2 minuti, 35 cicli di denaturazione a 94°C per 20 secondi, 20 secondi a 68°C per l'*annealing* dei *primer*, una fase di estensione a 72°C di 30 secondi e un ciclo finale di 72°C per 10 minuti. Sono stati utilizzati i *primer Forward* OLI-1 e *Reverse* Y-2, che consentono di amplificare geni costitutivi di una proteina ribosomiale di *R. solanacearum* (Seal et al., 1993). La presenza del genoma batterico è stata indicata dalla banda di amplificato di 288 basi. Al termine della reazione di amplificazione, i campioni sono stati visualizzati mediante gel di agarosio all'1.5 % con Buffer TAE 1X.

Presso il "Plant Resistance Genes Database" (<http://prgdb.cbm.fvg.it>) è stata effettuata una ricerca per l'identificazione di geni di resistenza a *R. solanacearum*. Successivamente il software "Primer 3", disponibile al link <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>, è stato usato per il disegno dei *primer* utili all'identificazione di sequenze omologhe ai geni di resistenza individuati sul "Plant Resistance Genes Database" e per l'identificazione dello stesso nelle specie selvatiche oggetto di questo studio.

2.2.4 Saggio di sensibilità a PVY

Per i test di resistenza è stato usato il ceppo di PVY^{NTN} isolato in Campania da patata e già caratterizzato biologicamente, sierologicamente e molecolarmente da Parrella et al. (2011). Questo lavoro è stato svolto in collaborazione con la prof.ssa D. Alioto, del dipartimento di Arboricoltura, Botanica e Patologia Vegetale, della facoltà di Agraria dell'Università degli Studi di Napoli Federico II. Per ogni clone selvatico di patata è stato condotto un test nel periodo primaverile e uno nel periodo autunnale. Per ogni test, e per ogni clone, sono state utilizzate 12 *vitro*-piante di quattro settimane, acclimatate in camera di crescita e successivamente trasferite in serra. Al raggiungimento di 25-30 cm di altezza, 10 piantine per genotipo sono state inoculate meccanicamente mediante sfregamento con carburo di silicio e con succo infetto contenente il virus estratto da foglia di *Nicotiana glutinosa* L. in tampone fosfato pH 7.0. Le rimanenti 2 piantine sono state sfregate con carburo di silicio, ma non sono state inoculate, per cui hanno rappresentato i campioni controllo. Due piantine di *Nicotiana glutinosa* inoculate, hanno rappresentato il controllo della vitalità e dell'infettività del ceppo utilizzato. Le piante inoculate, allevate in vasetti con terriccio sterile, sono state innaffiate e lasciate in serra ad una temperatura tra i 23 ed i 25°C.

La presenza del virus è stata valutata a 15 e 30 giorni dall'inoculo, sulle piantine inoculate e sui controlli, mediante saggi immuno-enzimatici di tipo DAS-ELISA (*Double Antibody Sandwich-Enzyme-Linked Immunoassorbent Assay*), utilizzando kit di identificazione, costituiti da anticorpi policlonali (Pabs) della ditta Loewe Biochemica GmbH, ed anticorpi monoclonali (Mabs) della ditta Bioreba. Gli antisieri utilizzati erano in grado di riconoscere i ceppi di PVY. Le piastre di polistirene (Greiner, f form) sono state sensibilizzate con immunoglobuline specifiche per il PVY (IgG) diluite 1:200 (Kit Loewe) e incubate per 4 ore a 37° C. Successivamente sono state lavate 5 volte con tampone di lavaggio PBS-T (NaCl, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, KCl, NaN₃, Tween) a pH 7.4 per eliminare l'eccesso di antisiero non adsorbito. Per la preparazione del campione 1 g di foglie prelevate al di sopra del punto di inoculo è stato posto in bustine di polietilene per l'omogenizzazione a cui sono state addizionate 9 parti (p/v) di tampone di estrazione (PBS-T + 2% PVP + 2% latte). Il succo vegetale (100 ml) così ottenuto è stato caricato in duplice copia nella piastra ELISA e posto in incubazione tutta la notte a 4°C. Il giorno successivo le piastre sono state lavate per 5 volte con PBS-T. Successivamente è stato aggiunto un secondo anticorpo (100 µl), specifico per il PVY e coniugato con la fosfatasi alcalina, diluito 1:200 (Kit Loewe) nel tampone di estrazione. Le piastre sono state incubate per 4 ore a 37°C. Dopo l'incubazione ed il lavaggio delle stesse, 100

μl di substrato enzimatico (p-nitrofenilfosfato), diluito in tampone substrato (Dietanolammina, NaN₃ pH 9.8 1mg/ml) sono stati distribuiti in tutti i pozzetti. Infine è stata effettuata una lettura spettrofotometrica a 10, 20, 40 minuti dall'aggiunta del substrato enzimatico, alla lunghezza d'onda di 405 nm, con un lettore Biorad Microplate Reader 550. I campioni sono stati considerati positivi quando i valori di densità ottica (DO) erano almeno due volte superiori ai valori di DO del controllo non inoculato. Tale valutazione è stata effettuata anche dall'analisi del parametro I/S, che indica il rapporto tra campione infetto e sano. Valori di I/S superiori a 3 indicano campioni infetti (suscettibili) in cui vi è la presenza del virus, valori inferiori a 3 indicano campioni sani (resistenti) in cui il virus è assente.

2.2.5 Analisi molecolari per individuare la resistenza a PVY

Per identificare la presenza del genoma virale nei genotipi inoculati e sottoposti a test DAS-ELISA, 1 mg di campione di foglia prelevata al di sopra del punto di inoculo è stato sottoposto ad estrazione di RNA mediante “*RNeasy Mini Kit*” fornito dalla Qiagen. La quantità e la qualità dell'RNA estratto è stata valutata mediante l'ausilio di uno spettrofotometro NanoDrop ND-1000 /NanoDrop Technologies, LLC, Wilmington e mediante gel d'agarosio al 1.2% in TBE buffer. Successivamente l'RNA estratto è stato sottoposto a RT-PCR con “SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum® *Taq*” fornito dalla Invitrogen. La reazione è stata condotta in 25 μl di volume finale contenente 1000 ng di RNA, Mix PCR (1X), RT/Platinum® *Taq* (1U), *primer Forward* e *primer Reverse* (0.2 μM). Il ciclo di amplificazione utilizzato ha previsto una fase di sintesi del cDNA a 50°C per 30 minuti e a 94°C per 2 minuti; poi 40 cicli di denaturazione a 94°C per 15 secondi, 30 secondi a 55°C per l'*annealing* dei *primer*, una fase di estensione a 72°C della durata di 1 minuto, e un ciclo finale di 72°C per 10 minuti. Per l'amplificazione sono stati utilizzati i *primer Forward* PVYc3 e *Reverse* PVYf (Rigotti e Gugerli, 2007), utili nel discriminare i differenti ceppi virali di PVY grazie alla presenza di un unico amplificato di 440 basi. Nel ceppo non ricombinante PVY^{NTN} oltre a un amplificato di 440 basi ottenuto con la coppia di *primer* PVYc3/f, si ottiene un'ulteriore amplificato di 1.11 kb con la coppia di *primer* PVY3+/3-. Per il ceppo PVY⁰, invece, con la coppia di *primer* PVYc3/f, si ottiene un unico amplificato di 660 basi (Rigotti e Gugerli, 2007). Al termine della reazione di amplificazione, i campioni sono stati visualizzati mediante gel di agarosio all'1.5 % con Buffer TBE 1X. Infine, presso il “Plant Resistance Genes Database” (<http://prgdb.cbm.fvg.it>), è stata effettuata una ricerca per l'identificazione di geni di resistenza a PVY. Successivamente il software “Primer 3”

(<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) è stato usato per il disegno dei *primer* utili all'identificazione di sequenze omologhe al gene di resistenza individuato sul "Plant Resistance Genes Database" e per l'identificazione dello stesso nelle specie selvatiche oggetto di questo studio.

2.2.6 Analisi SSR

Il DNA genomico estratto delle specie selvatiche e dalle varietà coltivate è stato sottoposto ad analisi con marcatori molecolari SSR selezionati presso il sito <https://research.cip.cgiar.org/confluence/display/IPD/SSR+Marker>; le caratteristiche dei marcatori sono riportate nella tabella 2.2.

Per l'amplificazione di ciascun marcatore molecolare SSR è stata preparata una miscela di reazione del volume finale di 20 µl costituita dai seguenti componenti: *primer Forward* marcato con fluorocromo (*Hex* o *Fam*) e *primer Reverse* (4 µM); dNTPs (0.2 mM); taq-polimerasi (1U); Buffer PCR 1X (10 mM Trizma-HCl, pH 8.3 at 25 °C, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂); MgCl₂ (1.5 mM); DNA (30 ng). La reazione di amplificazione è stata condotta con il termociclatore Veriti Thermacycler (Applied Biosystem). Il ciclo PCR è stato realizzato secondo tre fasi come segue. Una prima fase di tipo *touch down*, con decremento della temperatura di *annealing* di 1°C ad ogni ciclo di amplificazione, ha previsto 5 cicli così caratterizzati: 45 secondi a 94°C, 60 secondi alla temperatura di *annealing* dei *primer* aumentata di 5°C, e 30 secondi a 72°C. La seconda fase definita di amplificazione, ha previsto 30 cicli così caratterizzati: 45 secondi a 94°C, 60 secondi a 56°C, e 30 secondi a 72°C. La terza fase di elongazione finale, ha previsto un ciclo della durata di 20 minuti a 72°C. I campioni amplificati sono stati visualizzati mediante elettroforesi su gel al 2% agarosio in TAE buffer.

Gli ampliconi ottenuti sono stati analizzati mediante elettroforesi capillare con il Sequenziatore 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem) a singolo capillare da 36 cm con polimero POP7 presso la piattaforma tecnologica *GenoPom* (<http://wpage.unina.it/genopom>). Per ogni corsa elettroforetica è stato miscelato un campione marcato con *HEX* e uno con *FAM*, per un totale di sei coppie di *primer* marcate con *HEX* e sei con *FAM*. Gli amplificati di due coppie di *primer* sono stati miscelati con rapporti *HEX:FAM* 1:6. A ciascun campione è stata aggiunta la formammide Hi-Di e il marcatore di peso molecolare ROX500 (Applied Biosystem). A seguito dalla corsa elettroforetica capillare, l'elettroferogramma ottenuto per ciascun amplificato è stato analizzato mediante il software PeakScanner® (Applied Biosystem). I dati ottenuti sono stati analizzati e interpretati con il software GenAlex 6 (Genetic Analysis in Excel) (Peakall e Smouse, 2006) poi sono stati convertiti in una matrice binaria in cui è stata riportata per ogni genotipo analizzato la presenza (1) e l'assenza (0) di alleli.

Per l'analisi filogenetica delle specie considerate è stata calcolata la distanza genetica utilizzando il coefficiente di “*simple matching*” dato dal seguente rapporto: $SM_{ij} = (a+d)/(a+b+c+d)$. Dove SM è la similarità tra due genotipi i e j ; a è il numero di alleli presenti in entrambi i genotipi; b il numero di alleli presenti in i ed assenti in j ; c è il numero di alleli presenti in j ed assenti in i ; d indica il numero di alleli assenti in entrambi i campioni (Sokal e Michener, 1958). Qualora tra due campioni vi sia un grado di somiglianza elevato, il coefficiente tende a uno, in caso contrario tende a zero.

Per valutare le relazioni esistenti fra i campioni in base alla distanza genetica calcolata, è stato usato l'algoritmo di clusterizzazione UPGMA (*Unweighted Paired Group Method using Arithmetic Average*). La matrice di similarità è stata prodotta mediante il software NTSYS-PC (Rohlf, 2000), mentre mediante il *software* R (R project.org) è stato costruito un dendrogramma che consente di visualizzare il grado di similarità tra i gruppi genici. Infine per l'analisi delle relazioni tassonomiche riscontrate tra le varietà di *S. tuberosum* è stato usato il *database* dei pedigree di patata disponibile al sito <http://www.plantbreeding.wur.nl/potatopedigree/>.

Tabella 2.2 Marcatori molecolari SSR selezionati. Per ogni marcatore vengono riportati i codici identificativi, i motivi ripetuti, il numero di accessione che li identifica presso il GenBank, la sequenza e la lunghezza in paia di basi dei *primer* e la grandezza in paia di basi (bp) del marcatore amplificato (Ghislain et al., 2009).

Codice identificativo	Motivo ripetuto	Accessione GenBank	Sequenza <i>primer</i>	Lunghezza (bp)	Dimensione marcatore (bp)
STM1053	(TA) ₄ (ATC) ₅	AB022690	Fw_TCTCCCCATCTTAATgTTTC Rv_CAACACAgCATACAgATCATC	20	170–196
STM0031	(AC) ₅ ... (AC) ₃ (GCAC) (AC) ₂ (GCAC) ₂	[PAC50]	Fw_CATACgCACgCACgTACAC Rv_TTCAACCTATCATTTTgTgAgTCg	19	185–211
STM1104	(TCT) ₅	EU548082	Fw_TgATTCTCTTgCCTACTgTAATCg Rv_CAAAgTggTgTgAAgCTgTgA	24	178–199
STM1052	(AT) ₁₄ GT (AT) ₄ (GT) ₆	AJ133765	Fw_CAATTTTCgTTTTTTTCATgTgACAC Rv_ATggCgTAATTTgATTTAATACgTAA	24	214–263
STM1106	(ATT) ₁₃	X95821	Fw_TCCAgCTgATTggTTAggTTg Rv_ATgCgAATCTACTCgTCATgg	21	145–211
STM5114	(ACC) ₇	[p102B19]	Fw_AATggCTCTCTCTgTATgCT Rv_gCTgTCCCAACTATCTTTgA	20	297–322
STM5127	(TCT) ₅	[p23e7]	Fw_TTCAAgAATAggCAAAACCA Rv_CTTTTTCTgACTgAgTTgCCTC	20	248–291
STG0001	(CT) ₁₀	BE340539	Fw_CAgCCAACATTTgTACCCCT Rv_ACCCCCCACTTgCCATATTTT	20	137–163
STI0004	(AAG) _n	BQ118939	Fw_GCTgCTAAACACTCAAgCAgAA Rv_CAACTACAAGATTCCATCCACAg	20	83–126
STI0012	(ATT) _n	U69633	Fw_gAAgCgACTTCCAAAATCAgA Rv_AAAGggAggAATAgAAACCAAAA	21	183–234
STI0030	(ATT) _n	BF188393	Fw_TgACCCTCCAAGTATgATTCTTC Rv_TgACAACCTTTAAAgCATATgTCAgC	25	94–137
STI0032	(GGA) _n	BQ120452	Fw_TgggAAgAATCCTgAAATgg Rv_TgCTCTACCAATTAACggCA	20	127–148

2.3 Risultati

2.3.1 Saggio di sensibilità a *R. solanacearum* e analisi molecolari

La tabella 2.3 mostra per tutti i genotipi testati l'indice medio di malattia (IM) ottenuto al penultimo rilievo effettuato al diciottesimo giorno dall'inizio del test. Dei 19 genotipi testati 3 hanno mostrato un indice di malattia (IM) inferiore a 1 per cui sono stati classificati come resistenti (R), 2 come mediamente resistenti (MR) in quanto hanno mostrato un IM compreso tra 1 e 2.5 e i rimanenti sono risultati suscettibili (S) perché con IM maggiore di 2.5. I genotipi resistenti sono risultati cloni delle specie selvatiche *S. bulbocastanum* e *S. commersonii*.

Tabella 2.3 Indice di malattia medio (IM) rilevato al diciottesimo giorno dall'inoculo artificiale con il batterio *R. solanacearum* nelle specie selvatiche di patata. Viene riportata la specie selvatica, il codice del clone, l'IM, la deviazione standard e il fenotipo riscontrato. La lettera R indica i genotipi resistenti, MR indica i mediamente resistenti, S i suscettibili. Il simbolo (-) indica l'assenza del dato.

Specie selvatiche	Clone	IM	Dev. standard	Fenotipo
<i>Solanum acaule</i>	ACL1B	4.00	1.4	S
	ACL1C	4.00	0	S
<i>Solanum bulbocastanum</i>	BLB1C	3.63	1.1	S
	BLB2C	0.00	0	R
	PT29	0.14	0.3	R
<i>Solanum cananense</i>	CAN1B	4.00	0	S
<i>Solanum cardiophyllum</i>	CPH2A	3.71	0	S
	CPH1C	3.10	0.5	S
<i>Solanum chacoense</i>	CHC1A	1.13	1.8	MR
	CHC1B	3.57	1.1	S
<i>Solanum commersonii</i>	CMM1T	0.00	0	R
<i>Solanum etuberosum</i>	ETB3	2.00	1.9	MR
<i>Solanum fendleri</i>	FEN1B	4.00	0	S
	FEN2B	4.00	0	S
<i>Solanum multidissectum</i>	MLT1A	4.00	0	S
<i>Solanum phureja</i>	IVP35	4.00	0.5	S
<i>Solanum stoloniferum</i>	STO1A	3.50	1.4	S
	STO1C	4.00	1	S
<i>Solanum tarijense</i>	TAR2B	4.00	0.3	S

Nel grafico riportato in figura 2.2 è stato rappresentato l'andamento dell'indice medio di malattia in due genotipi resistenti (BLB2C, PT29), in due mediamente resistenti (ETB3, CHC1A) e

in uno suscettibile (ACL1B). E' risultato evidente che in entrambi i genotipi resistenti, l'indice medio di malattia si è mantenuto pari a zero fino al quarto rilievo, effettuato al quindicesimo giorno dall'inoculo, aumentando di poco nei rilievi successivi; nei genotipi mediamente resistenti l'IM è variato da valori inferiori a 1 fino a 2.5; infine, l'IM del genotipo suscettibile è risultato nettamente superiore a tutti gli altri.

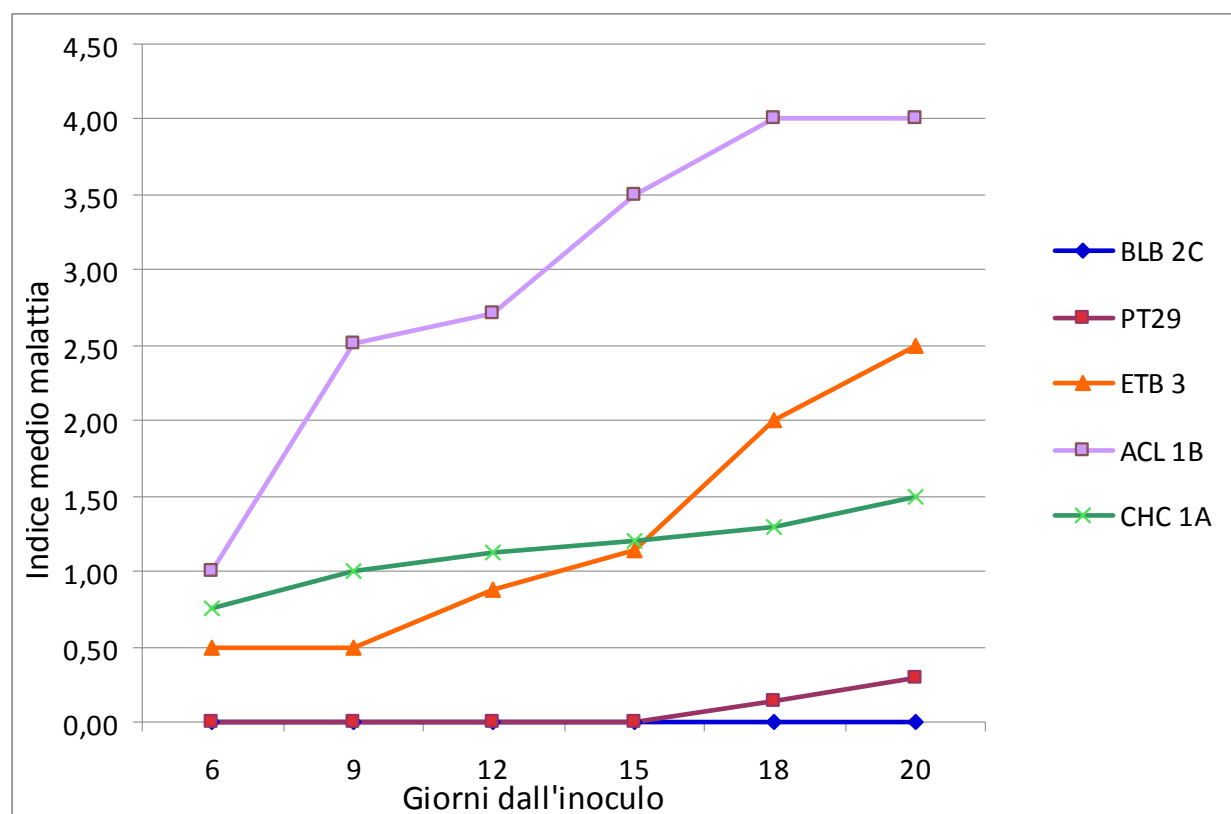


Figura 2.2: Indice medio di malattia osservato a 6, 9, 12, 15, 18, 20 giorni dall'inoculo di *R. solanacearum*, nei genotipi resistenti BLB2C e PT29, mediamente resistenti ETB3 e CHC1A, e suscettibili ACL1B.

I saggi di piastratura su terreno selettivo SMSA, condotti al quindicesimo giorno dall'inoculo su piantine dei genotipi resistenti, non hanno mostrato crescita batterica dagli estratti provenienti dalla porzione apicale, mentre vi è stata formazione di colonie batteriche dalla piastratura dell'estratto corrispondente alla porzione radiale delle stesse. Per i genotipi classificati come mediamente resistenti e suscettibili, invece, è stata rilevata crescita batterica dalla piastratura dell'estratto prelevato da entrambe le porzioni della pianta (dati non mostrati).

Le analisi molecolari condotte mediante PCR con *primer* specifici per l'individuazione del genoma batterico (OLI-1 e Y-2, Direttiva Europea), effettuate a 15 giorni dall'inoculo sul DNA estratto da tutti i genotipi, hanno consentito di individuare la presenza dell'amplificato di 288 basi corrispondente al genoma batterico, in entrambe le porzioni vegetali in tutti i genotipi,

indipendentemente dalla risposta di resistenza o suscettibilità. Ciò suggerisce una maggiore sensibilità del metodo PCR rispetto a quello di piastratura (dati non mostrati).

A 30 giorni dall'inoculo i risultati ottenuti dai saggi di piastratura SMSA concordano con i rilievi molecolari. Per tutti i genotipi resistenti infatti, l'assenza di traslocazione del batterio dalla porzione radicale a quella apicale è stata dimostrata dall'assenza di colonie batteriche su piastra in corrispondenza del estratto della porzione apicale, e la presenza di colonie batteriche dall'estratto proveniente dalla porzione radicale (Figura 2.3). Analogo risultato è stato ottenuto per le amplificazioni PCR, in cui il genoma batterico è presente nel DNA estratto dalla porzione radicale e assente da quella apicale (Figura 2.4). Per i genotipi mediamente resistenti e suscettibili invece, i saggi di piastratura (Figura 2.3) e le analisi molecolari hanno indicato la presenza del batterio in entrambe le porzioni vegetali analizzate (Figura 2.4). Tale risultato suggerisce che i genotipi resistenti siano invasi dal batterio, che è stato inoculato a livello radicale, ma con il passare del tempo attivino meccanismi che consentano di ridurre la carica batterica, tanto da non essere più presente né la crescita su piastre selettive né l'amplificato PCR a livello apicale.

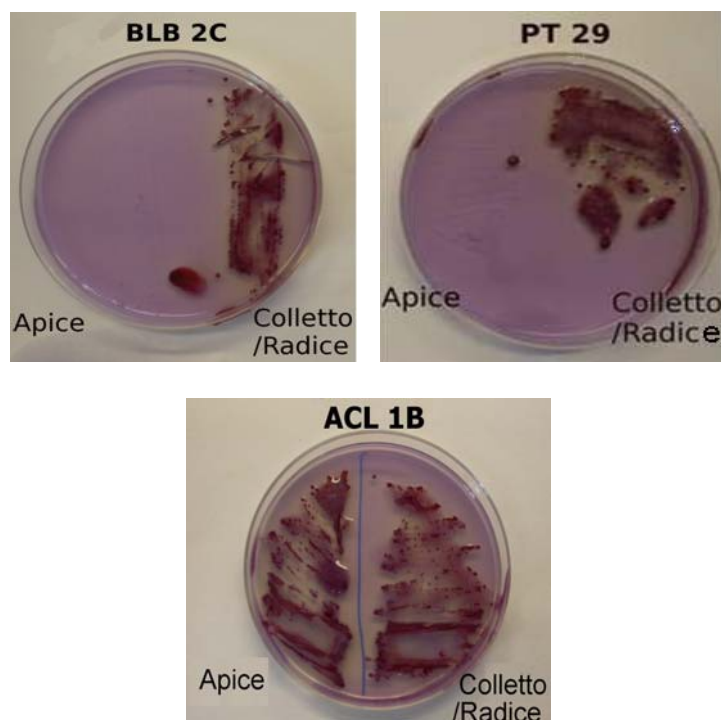


Figura 2.3: Saggi di piastratura su terreno selettivo SMSA degli estratti vegetali ottenuti dalla porzione apicale (Apice) e da quella radicale (Colletto/Radice) per i genotipi resistenti BLB2C e PT29 della specie selvatica *S. bulbocastanum* e per il genotipo suscettibile (ACL1B) a 30 giorni dall'inoculo. E' evidente l'assenza di crescita in corrispondenza della porzione apicale e la presenza di crescita batterica dalla porzione radicale per entrambi i genotipi resistenti. Per il genotipo suscettibile è visibile la crescita batterica in corrispondenza di entrambe le porzioni.

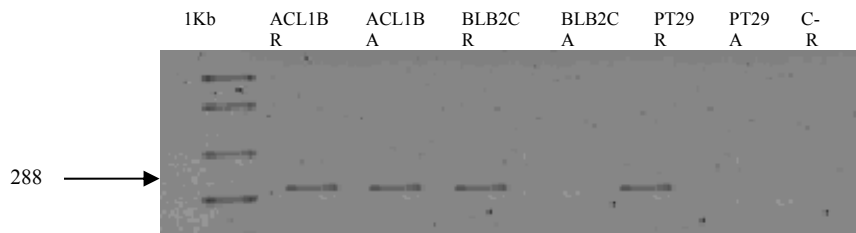


Figura 2.4: RT-PCR condotta a 30 giorni dall'inoculo con i *primer* specifici per *R. solanacearum*. L'amplificato di 288 bp è evidente nel DNA estratto e amplificato dalla porzione radicale (R) e apicale (A) del genotipo suscettibile (ACL1B). Assenza dell'amplificato è stata riscontrata nella porzione apicale dei genotipi resistenti (BLB2C e PT29) e nel controllo negativo non inoculato (C-).

Individuati i cloni fenotipicamente resistenti al patogeno è stata ricercata in essi la presenza di geni di resistenza allo stesso. Preso il “Plant Resistance Genes Database” sono stati individuati solo due geni di resistenza a *R. solanacearum*, entrambi studiati in *A. thaliana* e identificati mediante analisi computazionale. Il primo, indicato con la sigla “*ER-ERECTA*”, essendo una chinasi e non ha destato interesse. Il secondo, indicato come “*RRS1*”, è stato analizzato con maggiore attenzione perché appartenente alla classe *TNL* specifica dei geni di resistenza (Lahaye, 2004). Nella regione codificante della sequenza genica riportata per *RRS1*, con l'ausilio del software “Primer3”, sono state disegnate 4 coppie di *primer* (Tabella 2.4). Esse sono state usate per l'identificazione mediante PCR di omologhi del gene *RRS1* nelle specie selvatiche oggetto di studio. Tale ricerca non ha dato risultati positivi in nessuno dei genotipi analizzati (dati non mostrati). L'assenza dell'amplificato nelle specie selvatiche è stata attribuita all'assenza del gene di resistenza o all'inefficienza dei *primer* disegnati.

Tabella 2.4 *Primer* disegnati sulla sequenza del gene *RRS1*. I primi due sono stati costruiti in domini conservati dei geni di resistenza gli altri due nella regione codificante. Viene riportato il codice assegnato al *primer*, la sequenza del *primer Forward* e *Reverse* in direzione 5'-3', la temperature di *annealing* (Ta) espressa in °C e la lunghezza dell'amplificato atteso espresso in nucleotidi (bp).

Codice identificativo	Sequenza	Ta °C Fw(Rv)	Lunghezza amplificato (bp)
RRS1a	Fw GGCTCGTCAACTTTTCTTGC Rv ACAGGCCTTCGATCTCTTCA	60(60)	596
RRS1b	Fv AGGGTTTTCTCGGAACCTA Rv CAGGCCTTCGATCTCTTCAG	59.9(60)	456
RSS1c	Fw ACCAATCCAGGAAGGAATGT Rv GATGCCTATCGGTTGCTTGT	58.30(60.10)	149
RSS1d	Fw GGAACCAAGAACCTGGAGATG Rv AAGACTTGAGCAACCCGAGA	60.8(59.9)	498

2.3.2 Saggi di sensibilità a PVY e analisi molecolari

I risultati dei saggi DAS-ELISA condotti a 15 e 30 giorni dall'inoculo del PVY^{NTN} sui 21 genotipi selvatici ha consentito di individuare 4 genotipi resistenti al virus appartenenti alle specie selvatiche *S. bulbocastanum* (BLB1C), *S. etuberosum* (ETB3), *S. cardiophyllum* (CPH1C) e *S. phureja* (IVP35) (Figura 2.5). Tali genotipi hanno riportato valori di infetto su sano (I/S) inferiori a 3 e non hanno presentato sintomi sistemici visibili. Sono stati identificati, inoltre, due genotipi parzialmente resistenti: PT29 (*S. bulbocastanum*), in cui il numero di piante infette è aumentato gradualmente nel tempo, e CHC1A (*S. chacoense*), in cui la suscettibilità di tutti gli individui si manifesta solo a 30 giorni dall'inoculo (Figura 2.5 e Tabella 2.5). In tabella 2.5 sono state riportate le medie delle letture di densità ottica a 15 e 30 giorni dall'inoculo per tutti i genotipi analizzati. E' evidente come il genotipo CHC1A, che a 15 giorni è risultato resistente, nel test condotto a 30 giorni dall'inoculo è risultato mediamente resistente; PT29, invece, è risultato mediamente resistente già a 15 giorni dall'inoculo.

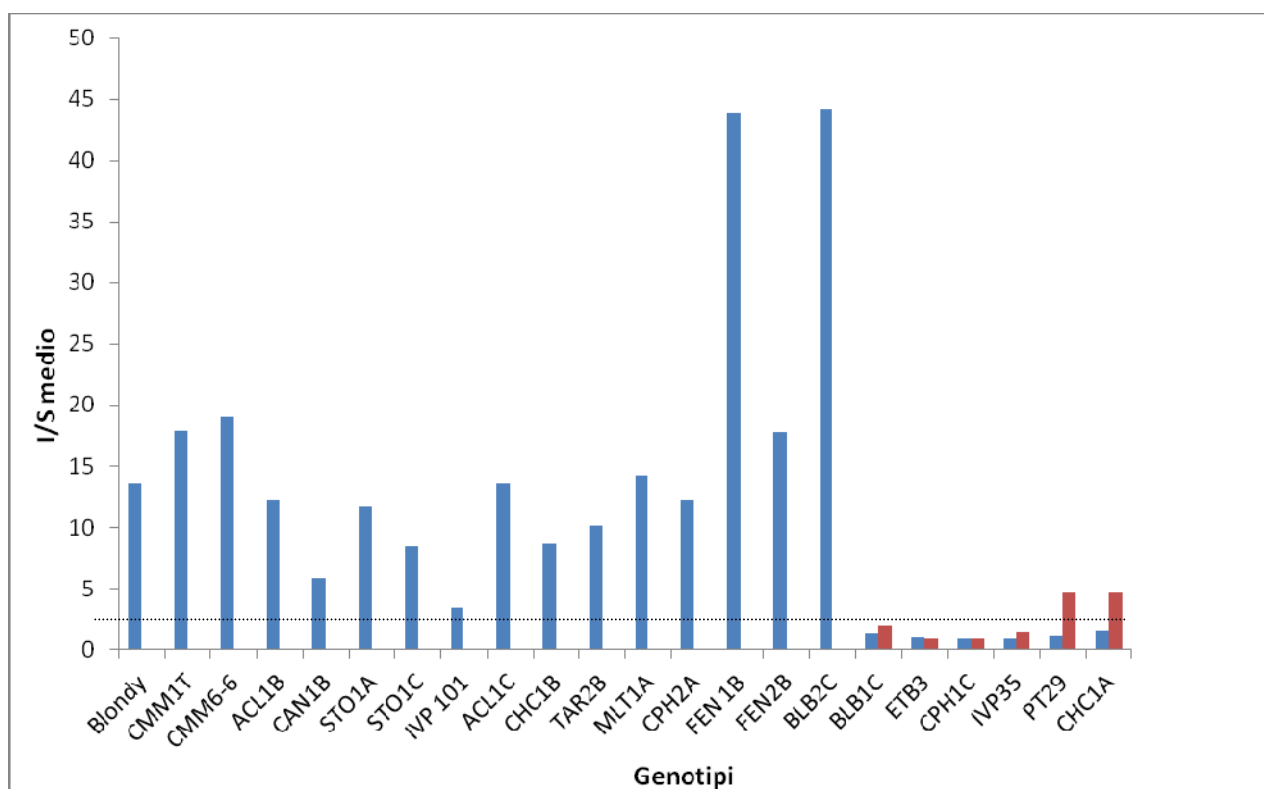


Figura 2.5: Risultati del test ELISA a 15 (barre blu) e 30 (barre rosse) giorni dall'inoculo. Per tutti i genotipi selvatici viene riportato il valore di infetto su sano medio (I/S). E' evidente come i genotipi resistenti (BLB1C, ETB3, CPH1C, VP35) abbiano valori al disotto del valore I/S soglia 3 (linea tratteggiata) anche a 30 giorni dall'inoculo. Blondy è la cultivar controllo di *S. tuberosum*.

Tabella 2.5 Media delle letture di densità ottica (OD) a 15 e 30 giorni dall'inoculo di PVY. Viene riportata la specie, il clone, la densità ottica media (OD), il valore di infetto su sano medio (I/S) e il fenotipo assegnato: S=suscettibile, R=resistente e MR=mediamente resistente. (-) indica l'assenza del dato a 30 giorni dall'inoculo per i genotipi risultati suscettibili a 15 giorni dall'inoculo.

SPECIE	CLONE	15 giorni dall'inoculo				30 giorni dall'inoculo			
		OD medio	I/S medio	n° piante infette/ n° inoculate	esito test	OD medio	I/S medio	n° piante infette/ n° inoculate	esito test
<i>Solanum acaule</i>	ACL1B	0.140	12.17	9 su 10	S	-	-	-	-
	ACL1C	0.252	13.62	9 su 10	S	-	-	-	-
<i>Solanum bulbocastanum</i>	BLB1C	0.016	1.36	0 su 6	R	0.030	2.01	0 su 12	R
	BLB2C	0.531	44.21	6 su 6	S	-	-	-	-
	PT29	0.116	6.60	1 su 6	MR	0.158	13.68	2 su 12	MR
<i>Solanum cananense</i>	CAN1B	0.123	5.86	4 su 10	S	-	-	-	-
<i>Solanum cardiophyllum</i>	CPH2A	0.153	12.24	9 su 10	S	-	-	-	-
	CPH1C	0.014	0.94	0 su 6	R	0.011	0.85	0 su 12	R
<i>Solanum chacoense</i>	CHC1A	0.022	1.54	0 su 6	R	0.047	4.74	8 su 12	MR
	CHC1B	0.144	8.72	8 su 10	S	-	-	-	-
<i>Solanum commersonii</i>	CMM1T	0.125	17.86	10 su 10	S	-	-	-	-
	CMM6-6	0.305	19.06	10 su 10	S	-	-	-	-
<i>Solanum etuberosum</i>	ETB3	0.016	1.07	0 su 6	R	0.019	0.87	0 su 12	R
<i>Solanum fendleri</i>	FEN1B	0.571	43.91	6 su 6	S	-	-	-	-
	FEN2B	0.365	17.79	6 su 6	S	-	-	-	-
<i>Solanum multidissectum</i>	MLT1A	0.234	14.18	9 su 9	S	-	-	-	-
<i>Solanum phureja</i>	IVP35	0.013	0.91	0 su 6	R	0.018	1.50	0 su 12	R
	IVP101	0.053	3.40	6 su 10	S	-	-	-	-
<i>Solanum stoloniferum</i>	STO1A	0.152	11.67	10 su 10	S	-	-	-	-
	STO1C	0.150	8.55	10 su 10	S	-	-	-	-
<i>Solanum tarijense</i>	TAR2B	0.142	10.13	7 su 7	S	-	-	-	-
<i>Solanum tuberosum</i>	Blondy	0.193	13.63	10 su 10	S	-	-	-	-

Le analisi RT-PCR condotte con i *primer* PVYc3/f hanno confermato l'assenza del virus nei genotipi risultati resistenti dal test ELISA. Nei genotipi risultati positivi al virus, invece, è stata evidenziata la banda da 440 basi che indica l'amplificazione del genoma virale (Figura 2.6).

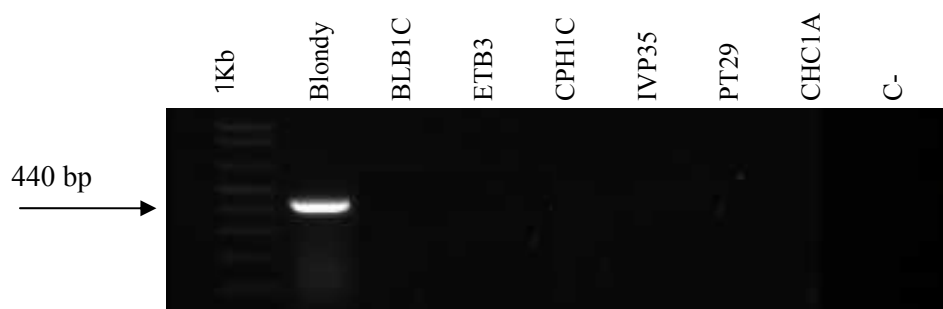


Figura 2.6: RT-PCR condotta con i *primer* PVYc3/f. Sono riportati da sinistra verso destra il marcatore di peso molecolare 1Kb, *S. tuberosum* cv. Blondy inoculato infetto, i genotipi resistenti (BLB1C, ETB3, CPH1C, IVP35), i mediamente resistenti (PT29, CHC1A), e il controllo negativo (C-).

Individuati i genotipi resistenti, in cui dopo l'inoculo l'infezione virale sembra essere bloccata, è stata ricercata in essi la presenza di geni di resistenza a PVY. Preso il "Plant Resistance Genes Database" è stato individuato un unico gene di resistenza a PVY ad oggi studiato su *S. tuberosum* subsp. *andigena* e indicato con la sigla "*RY-I*" (Vidal et al., 2002), appartenente alla classe *TNL* dei geni di resistenza. Al fine di individuare la presenza di tale gene nelle specie selvatiche oggetto di questo studio, sono state effettuate amplificazioni PCR con i *primer* SCAR RYSC3 e RYSC4 costruiti da Kasai et al. (2000) sulla regione ADG2 strettamente associata al gene *RY-I*. Inoltre, su tutte le specie selvatiche sono state condotte amplificazioni PCR con 4 coppie di *primer* disegnati con il *software* "Primer3" sulla sequenza del gene *RY-I* reperita presso il "Plant Resistance Genes Database". Le sequenze e le indicazioni utili per l'amplificazione dei marcatori SCAR e dei *primer* disegnati sono state riportate in tabella 2.6. Le amplificazioni PCR con i marcatori RYSC4 e con i *primer* costruiti in questa attività sulla sequenza di *RY-I*, hanno evidenziato assenza totale dell'amplificato o assenza del frammento del peso molecolare atteso (dati non mostrati). Le amplificazioni condotte con i marcatori RYSC3, invece, non hanno consentito di discriminare i genotipi resistenti dai suscettibili in quanto le bande di amplificato del peso molecolare atteso sono state individuate nei cloni resistenti e suscettibili appartenenti alla stessa specie. La banda di amplificato RYSC3 è stata individuata nelle seguenti specie selvatiche: *S. bulbocastanum* cloni BLB1C (R), BLB2C,

(S) PT29 (MR); *S. cardiophyllum* cloni CPH2A (S) e CPH1C (R); *S. commersonii* cloni CMM1T (S) e CMM6-6 (S); *S. fendleri* cloni FEN1B (S) e FEN2B (S); *S. multidissectum* clone MLT1A (S); *S. phureja* cloni IVP35 (R) e IVP101 (S); *S. stoloniferum* cloni STO1A (S) e STO1C (S). In figura 2.7 viene riportato un esempio per l'amplificazione ottenuta sui cloni della specie selvatica *S. bulbocastanum* BLB1C (R), BLB2C, (S) PT29 (MR).

Tabella 2.6 Marcatori SCAR RYSC3 e RYSC4 (Kasai et al., 2000) e *primer* disegnati sulla sequenza del gene *RY-1*. Vengono riportati il codice identificativo del *primer*, la sequenza *Forward* e *Reverse* in direzione 5'-3', la temperatura di *annealing* (Ta) espressa in °C e la lunghezza dell'amplificato atteso espresso in nucleotidi (bp).

Codice identificativo	Sequenza	Ta °C Fw(Rv)	Grandezza amplificato (bp)
RYSC3	Fw 3.3.3s ATACTCTCATCTAAATTTGAT GG Rv ADG23R AGGATATACGGCATCATTTTTCCGA	57(57)	321
RYSC4	Fw ADG21F AGTTCTAGTTGTGCTTGATAAC RV ADG23R AGGATATACGGCATCATTTTTCCGA	62(62)	145
RY-1a	Fw CTCCTCCCGTTTACCTTCC Rv CTCTTCGTTTGCTTCCGAAC	59(59)	426
RY-1m1	Fw CTTCTTCCTGCTTTACCCGTCC Rv GCTGAGTTACAGTGCAACTGCC	54.5(54.5)	404
RY-1m2	Fw GCAGCATTGGCGAGTTGAAAAG Rv ATACACGGCATCCCCTCATCAC	50(54.5)	766
RY-1m3	Fw AAAGCCCCTCACCCTGTAACC Rv AGAGCACGCATCTTGATCCAAC	54.5(50)	662

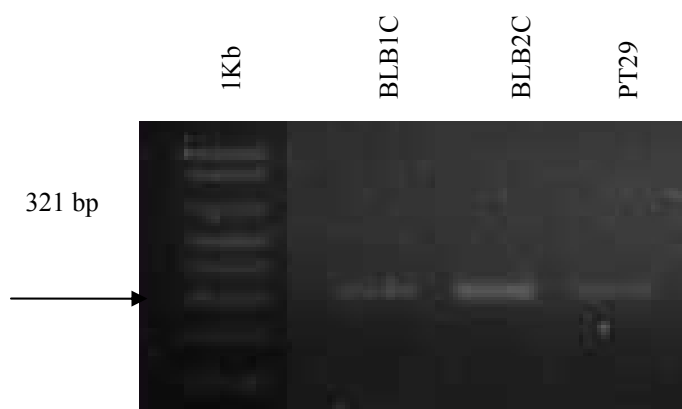


Figura 2.7: PCR condotta con la coppia di *primer* RYSC3 (Kasai et al., 2000). Sono evidenti i frammenti di amplificato di 321 basi nei tre cloni della specie selvatica *S. bulbocastanum* BLB1C (R), BLB2C, (S) PT29 (MR). 1Kb indica il marcatore di peso molecolare.

2.3.3 Analisi con i marcatori SSR

Per ognuna delle 12 coppie di *primer* SSR utilizzate è stato possibile definire le temperature di *annealing* migliori che consentono l'efficiente amplificazione dei marcatori (Tabella 2.7).

Tabella 2.7 Temperature di annealing migliori per l'amplificazione dei marcatori SSR. Viene riportato il codice, il motivo ripetuto e temperatura di *annealing* (Ta) dei *primer* SSR selezionati.

Codice <i>primer</i>	Motivo ripetuto	Ta ottimale (°C)
STM1053	(TA) ₄ (ATC) ₅	55
STM0031	(AC) ₅ ... (AC) ₃ (GCAC) (AC) ₂ (GCAC) ₂	52
STM1104	(TCT) ₅	57
STM1052	(AT) ₁₄ GT (AT) ₄ (GT) ₆	54
STM1106	(ATT) ₁₃	56
STM5114	(ACC) ₇	53
STM5127	(TCT) ₅	55
STG0001	(CT) ₁₀	55
STI0004	(AAG) _n	57
STI0012	(ATT) _n	53
STI0030	(ATT) _n	56
STI0032	(GGA) _n	54

Otto dei 12 marcatori SSR utilizzati in questo studio sono stati adoperati per le analisi condotte su tutte le specie selvatiche e coltivate, 4 sono stati utilizzati esclusivamente sulle specie selvatiche. In totale sono stati amplificati 50 alleli, con un range variabile da 2, per la coppia di *primer* STM1053 a 9 per STM5127; sono stati individuati in media 6.25 alleli per marcatore. Dall'analisi degli elettroferogrammi è emerso che il numero di alleli amplificati per genotipo è variato da 1 a 4.

In figura 2.8 sono stati riportati esempi degli elettroferogrammi ottenuti con la coppia di *primer* STI0030 (con fluorescenza blu) e con la coppia STM1104 (con fluorescenza verde) sui cloni IVP101 della specie selvatica *S. phureja* e sui cloni STO1A e STO1C della specie selvatica *S. stoloniferum*. Per tutti i cloni sono stati amplificati due marcatori con la coppia di *primer* STI0030 e uno con la coppia di *primer* STM1104, i quali dal confronto con il marcatore di peso molecolare ROX, hanno presentato pesi molecolari differenti (Figura 2.8).

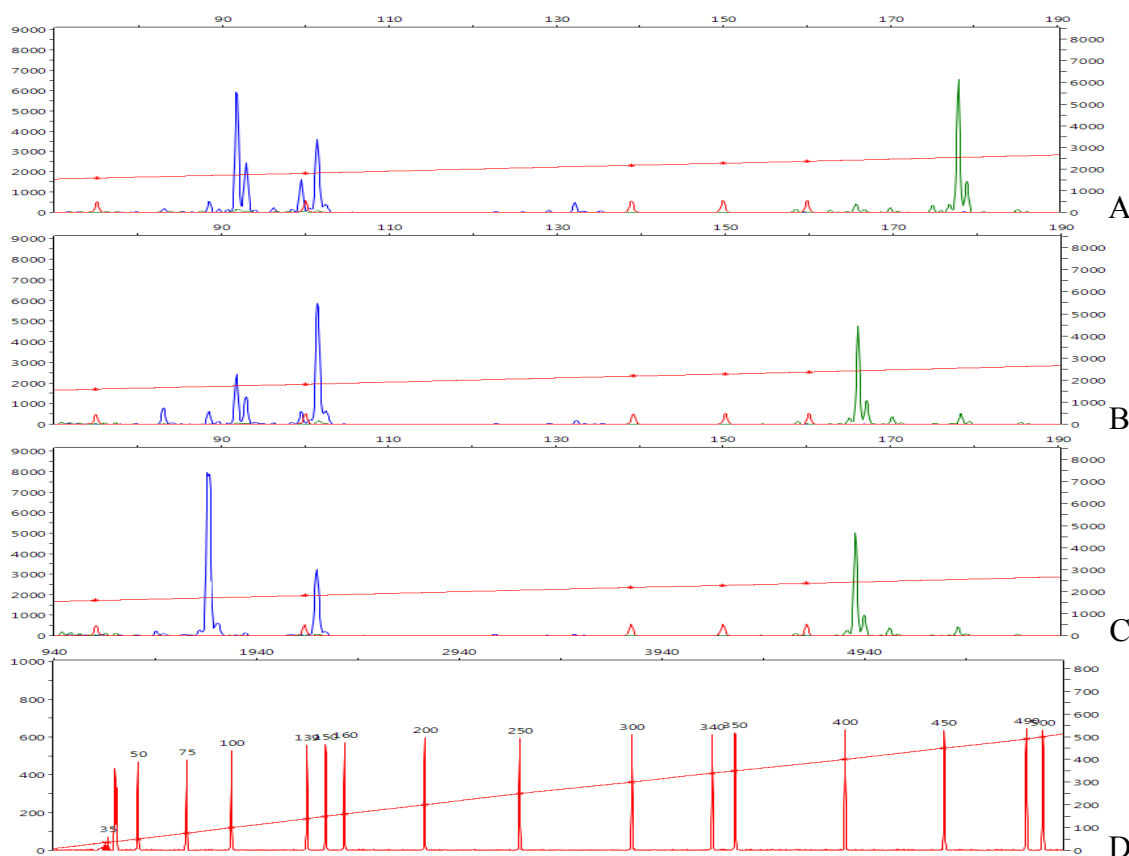


Figura 2.8: Elettroferogrammi ottenuti dall'elettroforesi capillare condotta sui cloni (IVP101) della specie selvatica *S. phureja* (A), ST01A (B) di e ST01C (C) della specie selvatica *S. stoloniferum* con le coppie di *primer* SSR STI0030, con fluorescenza blu e STM1104 con fluorescenza verde. Nel pannello D è raffigurato lo standard di peso marcatore molecolare ROX 500, con fluorescenza rossa.

Per gli otto marcatori utilizzati nell'analisi delle specie selvatiche e coltivate, il livello di polimorfismo intra-genotipo e inter-genotipo è stato valutato mediante il calcolo dei parametri PIC (*Polymorphic Information Content*) e PD (*Power of Discrimination*) riportati in tabella 2.8. Il valore PIC è variato da 0.33 circa per la coppia di *primer* STM1053 a 0.99 circa per la coppia STM1052. Il potere discriminante dei diversi marcatori utilizzati è risultato costante e alto, variando tra 0.973 e 0.975.

Dall'analisi effettuata con i marcatori molecolari SSR, inoltre, è stato possibile individuare un numero considerevole di alleli privati, ovvero alleli presenti esclusivamente in un genotipo e assenti in un altro o in tutti gli altri. Nello specifico, nel 45% dei genotipi selvatici analizzati sono stati individuati ben 20 alleli privati generici, ovvero alleli presenti nel genotipo selvatico e sempre assenti nelle 23 varietà coltivate utilizzate in questo studio. Le caratteristiche di tali alleli sono riportate in tabella 2.9. Inoltre, per tutte le specie selvatiche analizzate sono stati identificati numerosi alleli privati specifici, ovvero presenti in alcune specie selvatiche e mancati in alcune varietà coltivate. Per questioni di semplicità in tabella 2.10 sono stati riportati solo gli alleli privati individuati per i cloni BLB1C e BLB2C della specie selvatica *S.*

bulbocastanum, per CHC1A e CHC1B della specie selvatica *S. chacoense* e per CMM1T e CMM6-6 della specie selvatica *S. commersonii* nei confronti di tutte le varietà coltivate; tale analisi, tuttavia, è stata effettuata in tutte le specie selvatiche analizzate.

Tabella 2.8 Analisi statistiche effettuate sui risultati ottenuti con i marcatori SSR. Per ogni marcatore viene indicato il motivo ripetuto, il numero di alleli per marcatore e due parametri di diversità genetica, PIC e PD.

Marcatore SSR	Motivo ripetuto	Alleli per marcatore (nro)	PIC	PD
STI0032	(GGA) _n	7	0.8058	0.975
STM1053	(TA) ₄ (ATC) ₅	2	0.3324	0.975
STM5127	(TCT) ₅	9	0.8355	0.973
STM5114	(ACC) ₇	6	0.7686	0.973
STG0001	(CT) ₁₀	9	0.8805	0.975
STI0012	(ATT) _n	7	0.9831	0.975
STM1052	(AT) ₁₄ GT (AT) ₄ (GT) ₆	4	0.9926	0.974
STM1106	(ATT) ₁₃	6	0.8727	0.974

Tabella 2.9 Alleli privati generici individuati con marcatori SSR nei genotipi selvatici. Viene riportato il clone della specie selvatica, il marcatore SSR, l'allele privato in bp e, la frequenza allelica.

Genotipo selvatico	Marcatore SSR	Allele privato generico (bp)	Frequenza allelica
BLB1C	STI0004	81	0.500
CAN1B	STM1052	223	0.500
	STI0030	107	0.500
CHC1B	STI0030	105	0.500
CMM1T	STM5127	247	0.500
	STI0004	66	1.000
CMM66	STM5127	262	0.500
	STI0004	69	0.500
	STI0032	110	0.500
ETB3	STM5114	303	1.000
	STM5127	256	1.000
MLT1A	STM1104	169	0.250
IVP35	STI0004	99	0.500
IVP101	STG0001	127	1.000
TAR2B	STM0031	138	0.500
	STM0031	152	0.500
	STM5127	244	1.000
	STI0030	116	0.500
	STI0030	123	0.500
	STI0032	107	0.500

Tabella 2.10 Alleli privati specifici identificati nei cloni BLB1C e BLB2C di *S. bulbocastanum*, CHC1A e CHC1B di *S. chacoense* e CMM1T e CMM6-6 di *S. commersonii* nei confronti di tutte le alle varietà coltivate analizzate.

Varietà coltivate	Specie selvatiche					
	BLB1C	BLB2C	CHC1A	CHC1B	CMM1T	CMM6-6
ELFE	116, 131, 139, 151, 154, 174, 210, 250	116, 139, 148, 151, 154, 174, 210, 250	116,131,139,151, 154,174,210,289	116,125,131,148, 151,210,289	116,125,131,151, 174,210,247,250	116,125,131,151,21 0,253,262
VIVALDI	116, 119, 131, 151, 154, 174, 250, 286	116,119, 135, 148, 151, 154,174, 250, 286	116,131,151,154, 174	116,125,129,131, 148,151	116,125,131,151, 174,247,250	116,125,131,151,18 7,253,262
MARABEL	116, 131, 151, 154, 174, 210, 250	116, 135, 148, 151, 154, 174, 210	116,131,151,154, 174,210,289	116,129,131,148, 151,210,289	116,131,151,174, 210,247,250	110,116,131,151,21 0,253,262
BARTINA	119, 131, 151, 154, 168, 250, 286	119, 148, 151, 154, 168, 250, 286	131,151,154,168, 228	116,129,131,148, 151,168	125,131,151,168, 228,247,250,292	110,125,131,151,16 8,187,228,253,262, 292
DAYANA	116, 131, 139, 151, 154, 168, 250, 286	116, 139, 148, 151, 154, 168, 250, 286	116,131,139,151, 154,168,289	116,125,131,148, 151,168,289	116,125,131,151, 168,247,250,292	110,116,125,131,15 1,168,253,262,292
TERRAGOLD	116, 131, 151, 154, 250	116,148,151, 154,250	116,131,151,154, 228	116,125,131,148, 151	116,125,131,151, 247,250,292	110,116,125,131,15 1,187,228,262,292
PRIMURA	116, 131, 139, 151, 154, 250	116, 139, 148, 151, 154, 250	116,131,139,151, 154,228,241	116,125,131,148, 151,241	116,125,131,151, 247,250,292	110,116,125,131,15 1,187,228,253,262, 292
ASTERIX	116, 131, 151, 154, 174, 250	116, 148, 151, 154,174, 250	116,131,151,154, 174,228,241,289	116,125,129,131, 148,151,289	116,125,131,151, 174,247,250,292	110,116,125,131,15 1,187,228,253,262, 292
VOLUMIA	116, 131, 151, 174, 210, 250, 286	116, 135, 148, 151, 174, 210, 250, 286	116,131,151,174, 210	116,129,131,148, 151,210	116,131,151,174, 210,247,250,292	110,116,131,151,18 7,210,253,262,292
VERONIE	116, 119, 131, 139, 151, 174, 210, 250	116, 119,139, 148, 151,154, 174, 210, 250	116,131,139,151, 154,174,210,241	116,125,129,131, 148,151,210,241	116,131,151,174, 210,247,250	110,116,125,131,15 1,187,210,262
ARROW	116, 131, 151, 174, 250,286, 286	116, 148, 151, 154, 174, 250, 286	116,131,151,154, 174	116,125,129,131, 148,151	116,125,131,151, 174,247,250,292	116,125,131,151,18 7,228,262,292
Selezione RAF	116, 131, 151,168, 250	116, 135, 148, 151, 168, 250, 286	116,131,151,228	116,125,129,131, 148,151,168	116,125,131,151, 168,247,228,250, 292	110,116,125,131,15 1,168,187,228,253, 262,292
SIEGLINDE	116, 119, 131, 139, 151, 174, 250	116, 119, 135, 139, 148, 151,154, 174, 250	116,131,139,151, 154,174	116,125,129,131, 148,151	116,125,131,151, 174,247,250,292	110,116,125,131,15 1,187,262,292
SPUNTA	116, 131, 151, 168, 174, 250, 286	116, 139, 148, 151, 154, 168, 174, 250, 286	116,131,139,151, 154,168,174	116,125,129,131, 148,151,168	116,125,131,151, 168,174,247,250, 292	116,125,131,168,15 1,187,253,262,292
ELVIRA	116, 119, 131, 139, 151, 154, 174, 286	116, 119, 148, 151, 154, 174, 286	116,131,151,154, 174,289	116,125,129,131, 148,151	116,125,131,151, 174,247	116,125,131,151,18 7,253,262
FRISIA	116, 131, 139, 151, 154, 168, 174, 250, 286	116, 139, 148, 151, 154, 168, 174, 250, 286	116,131,139,168, 151,154,168,174	116,125,129,131, 148,151,168	116,125,131,151, 168,174,247,250, 292	110,116,125,131,15 1,168,187,253,262, 292
ANTEA	116, 131, 139, 151, 250, 286	116, 135, 148, 151,250	116,131,168,151, 228	116,125,129,131, 148,151	116,125,131,151, 174,228,247,250, 292	110,116,125,131,15 1,187,253,288,262, 292
LISETA	116, 131, 139, 151, 154, 174, 250, 286	116, 139, 148, 151, 154, 174, 250,286	116,131,139,151, 154,174	116,125,129,131, 148,151	116,125,131,151, 168,174,247,250, 292	110,116,125,131,15 1,187,253,262,292
ARINDA	116,131, 139, 151, 154, 250	116, 139, 148, 151, 154, 250	116,131,139,151, 154,228	116,129,131,148, 151	116,131,151,168, 247,228,250,292	110,116,131,151,18 7,228,253,262,292
INOVA	116, 131, 139, 151, 154, 174, 286	116, 139, 148, 151, 154,174, 286	116,131,139,151, 154,174,228	116,125,129,131, 148,151	116,125,131,151, 174,228,247	110,116,125,131,15 1,187,228,253,262
AGRIA	131, 151, 154, 174,250	135, 148, 151, 154, 174, 250	131,151,154,174	125,129,131,148, 151	125,131,151,174, 228,247,250,292	110,125,131,151,18 7,253,262,292
AGATA	116, 131, 139, 151, 154, 250, 286	116, 135, 139, 148, 151, 154, 250, 286	116,131,151,154, 228	116,125,131,148, 151	116,125,131,151, 228,247,250	110,116,125,131,15 1,187,228,253,262
BADIA	116, 131,139 , 151, 154, 210, 250	135, 148, 151, 154, 210, 250	116,151,154,210	116,125,129,131, 148,151,210	116,125,131,151, 210,247,250,292	110,125,131,151,18 7,210,253,262,292

Per la valutazione delle relazioni esistenti tra i campioni sulla base della distanza genetica tra essi presente, è stato costruito il dendrogramma riportato in figura 2.9. Tale dendrogramma ha permesso di valutare il grado di similarità presente tra le specie selvatiche e le specie coltivate. Nell'albero filogenetico ottenuto sono stati distinti due grandi *cluster* genetici: il *Cluster 1*, che comprende tutte le specie selvatiche, e il *Cluster 2*, che raggruppa tutte le varietà coltivate. All'interno di ciascun *cluster* sono stati osservati ulteriori raggruppamenti.

Nel *Cluster 1*, si distinguono tre principali raggruppamenti tra i cloni appartenenti alla stessa accessione di tre specie selvatiche (Figura 2.9). Il primo raggruppamento è rappresentato dai due cloni ACL1B e ACL1C dell'accessione 1 di *S. acaule*; il secondo dai cloni STO1A e STO1C dell'accessione 1 della specie *S. stoloniferum* e il terzo dai cloni CHC1A e CHC1B dell'accessione 1 della specie *S. chacoense*. I tre cloni della specie selvatica *S. bulbocastanum*, tutti appartenenti ad accessioni diverse, sono raccolti in un ulteriore raggruppamento in cui è stata osservata maggiore vicinanza filogenetica tra i cloni BLB2C e PT29 rispetto a BLB1C (Figura 2.9). I cloni delle altre specie selvatiche, invece, non risultano raggruppati né in base alla specie di appartenenza né in base all'origine. Inoltre, l'analisi filogenetica condotta con i marcatori SSR, non ha mostrato particolari correlazioni tra le specie selvatiche risultate resistenti a *R. solanacearum* e virus Y, prese in considerazione nei paragrafi precedenti.

Nel *Cluster 2* per le varietà coltivate sono stati individuati quattro raggruppamenti (Figura 2.9). Il primo caratterizzato esclusivamente dalla cultivar Blondy di *S. tuberosum*; il secondo dalle varietà Elfe, Marabel, Veronie, Sieglinde e Elvira; il terzo dalle varietà Vivaldi, Arrow, Spunta, Frisia, Liseta, Volumia, Agria e Badia; infine il quarto da Bartina, Primura, Arinda, Dayana, Terragold, Asterix, Raf, Antea, Agata e Inova. La cultivar Blondy, tra le varietà coltivate si è distinta geneticamente dalle altre, infatti, è stata quella che ha clusterizzato più vicino alle specie selvatiche. Dalle analisi del pedigree è emerso che tra i parentali presenta la specie selvatica *S. vernei*, quest'ultima non è presente tra le specie selvatiche usate in questo studio. Tramite le analisi del pedigree, inoltre, nel secondo raggruppamento è stato possibile individuare i parentali in comune tra le varietà Elfe e Marabel (Hansa), Elfe e Veronie (Aquila) ed Elvira e Sieglinde (Zwickauer Fruhe) che sono indicati tra parentesi. Nel terzo raggruppamento le varietà hanno presentano molti progenitori in comune, tra cui i più frequenti sono stati Saskia e Katahdin; le uniche varietà che non è stato possibile correlare al resto del gruppo sono state Agria e Badia. Infine, per l'ultimo raggruppamento non sono state evidenziate correlazioni genealogiche, ad eccezione di Arinda che è risultata strettamente correlata a Primura la quale, infatti, è presente nel suo pedigree.

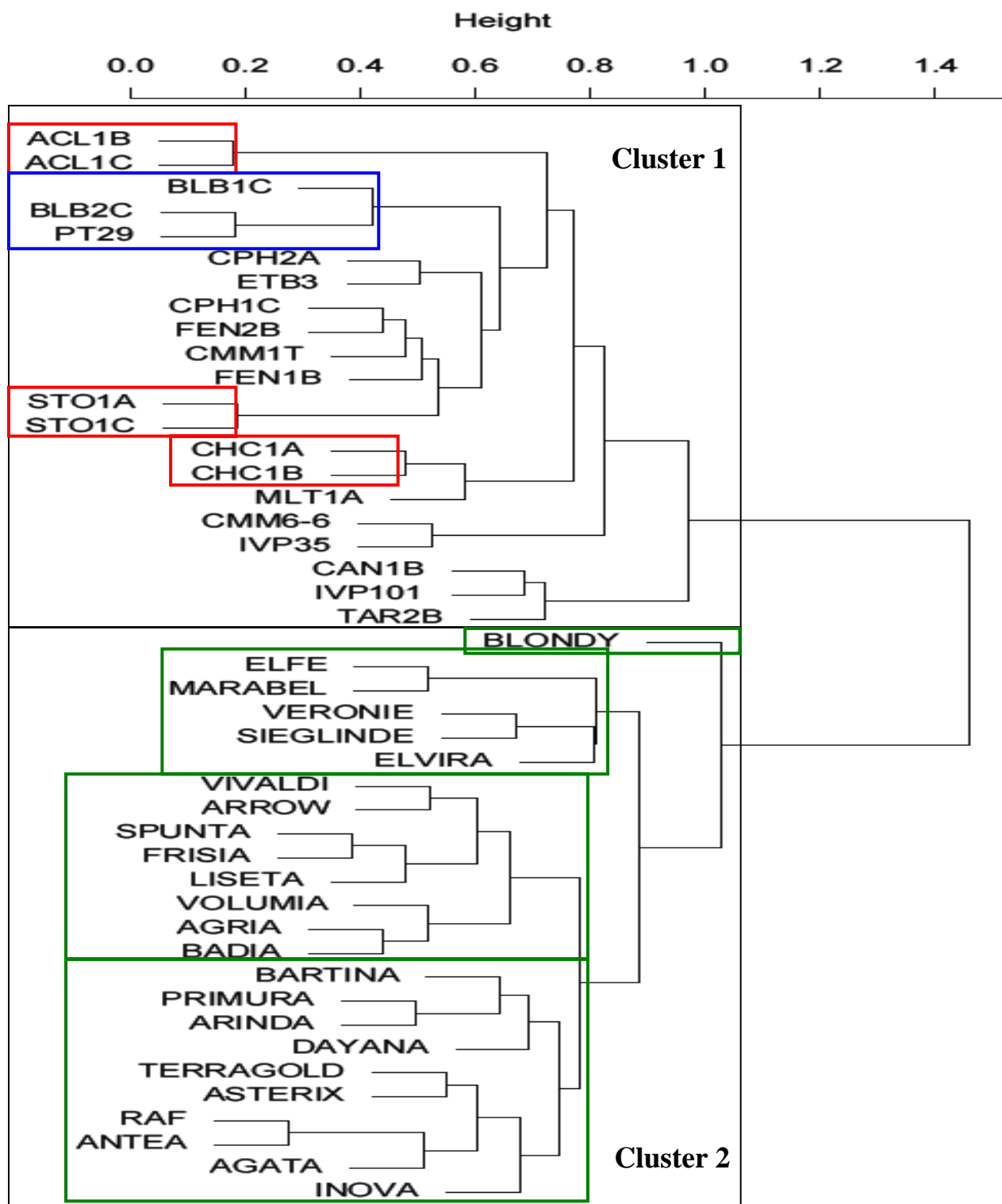


Figura 2.9: Dendrogramma ottenuto dall'analisi SSR per le specie selvatiche e le varietà coltivate oggetto di studio. Sono distinti i due *cluster* genetici identificati per le specie selvatiche (*Cluster 1*) e per le varietà coltivate (*Cluster 2*). In rosso e blu sono evidenziati i sottogruppi per le specie selvatiche *S. acaule*, *S. stoloniferum*, *S. chacoense* e *S. bulbocastanum*. In verde sono rappresentati i quattro raggruppamenti identificati tra le varietà coltivate. Maggiori delucidazioni nel testo.

Dalle analisi SSR condotte è stata ottenuta una matrice di similarità (Tabella 2.11) che riporta il grado di somiglianza genetica presente tra tutti i campioni, indicando con 1.00 l'identità e con zero la differenza. Il valore medio rilevato dal confronto tra le specie selvatiche e le varietà coltivate è risultato pari a 0.52. Il 39% dei confronti ha presentato valori variabili tra 0.38 e 0.49. Tra i valori medi osservati tra le specie selvatiche e le varietà coltivate non è stata osservata grossa discrepanza. Entro le specie selvatiche, infatti, il valore medio è risultato 0.73, mentre entro le varietà coltivate è risultato 0.67. Il valore più basso della matrice è stato identificato nel confronto tra specie e varietà ed è risultato 0.38. Il valore più alto, invece, è stato ottenuto nel confronto tra i cloni della stessa accessione ed è stato 0.97 (ad esempio ACL1B-ACL1C cloni dell'accessione 1 di *S. acaule*, e STO1A-STO1C cloni dell'accessione 1 di *S. stoloniferum*).

Tabella 2.11 Matrice di similarità calcolata sulla base degli indici di similarità ottenuti dalle analisi SSR effettuate sulle specie selvatiche e varietà coltivate di patata.

[illegible]

2.4 Discussione

La patata coltivata è suscettibile a un grosso numero di patogeni e ciò comporta la necessità di disporre di numerose risorse genetiche per il miglioramento della stessa. I *breeder* della patata sono avvantaggiati per questo dalla disponibilità di ampie risorse di germoplasma nell'ambito delle circa 200 specie selvatiche di patata, distribuite tra il sud est degli Stati Uniti al Cile e l'Argentina centrale e concentrati in Perù e Bolivia (Jansky, 2006). Uno dei metodi migliori per contrastare le patologie che affliggono la patata, quindi, è rappresentato dallo sviluppo di schemi di *breeding* che includono le specie selvatiche (Jansky et al., 2008). Nonostante questo però, solo il 10% circa di esse è stato analizzato nel miglioramento genetico; pertanto, esistono ancora numerose opportunità nel migliorare la patata coltivata utilizzando il suo germoplasma selvatico (Jansky, 2006).

Ad oggi il miglioramento genetico per l'introggressione di resistenze a stress biotici appare una priorità data le ingenti perdite di raccolto che si hanno ogni anno. La lotta chimica, pur essendo largamente impiegata, è spesso inefficace contro taluni patogeni e comporta anche un enorme impatto ambientale. D'altro canto la lotta genetica, basata sull'impiego di varietà resistenti, può contribuire a ridurre gli interventi chimici e l'impatto ambientale. Tuttavia, anch'essa presenta taluni limiti, rappresentati in primo luogo dall'individuazione di fonti di resistenza e dallo sviluppo di schemi di miglioramento per la loro introggressione, ma soprattutto dall'enorme plasticità presentata dai patogeni, i quali sono in grado di mutare rapidamente e superare i meccanismi di difesa attuati dall'ospite. Le numerose attività di ricerca per il miglioramento delle specie di interesse agrario, però, possono contribuire a superare tali limiti.

L'individuazione di fonti di resistenza rappresenta il primo passo da effettuare per migliorare dal punto di vista genetico la resistenza delle cultivar di patata. In questo studio, nuove fonti di resistenza a stress biotici, quali *R. solanacearum* e virus Y, sono state ricercate tra i 21 cloni di 12 specie selvatiche di patata disponibili presso il DiSSPAPA. Tali specie provengono da paesi del Centro Sud America, quali Messico, Bolivia, Perù, Uruguay, Cile, Argentina e Colombia. Alcune di esse sono già note per i numerosi caratteri di resistenza a stress biotici e abiotici riportati, ad esempio *S. bulbocastanum* nota per la resistenza a *P. infestans* e a caldo (van der Vossen et al., 2005). Altre ancora sono molto poco caratterizzate come *S. cananense* e *S. fendleri*. La maggior parte delle accessioni selvatiche usate in questo studio non era ancora stata caratterizzata per la resistenza a *R. solanacearum* e virus Y. Ad eccezione di *S.*

commersonii che in letteratura è già nota per la resistenza nei confronti di *R. solanacearum* (Laferriere et al., 1999; Carputo et al., 2009); e di *S. stoloniferum* che è stata già caratterizzata per la resistenza a PVY (Vidal et al., 2002; Song e Schwarzfischer, 2008).

I test di sensibilità a *R. solanacearum* hanno portato all'identificazione di un clone della specie selvatica *S. commersonii* (CMM1T) e di due cloni della specie *S. bulbocastanum* (BLB2C e PT29) resistenti, data la quasi completa assenza dei sintomi caratteristici della malattia, e di due cloni con livelli di resistenza più moderati, ETB3 (*S. etuberosum*) e CHC1A (*S. chacoense*). In accordo con il concetto largamente accettato e riportato da Chung et al. (2011) secondo cui specie aventi la stessa origine geografica o provenienti da popolazioni tassonomicamente vicine sono molto simili in termini di resistenza, le specie risultate resistenti e mediamente resistenti a *R. solanacearum*, ad eccezione di *S. commersonii*, sono originarie del Messico. L'identificazione di fonti di resistenza in specie originarie del Messico, un paese a clima tropicale, può suggerire una co-evoluzione tra queste specie selvatiche e il batterio responsabile della patologia da quarantena più importante nei climi tropicali. Presumibilmente la presenza in queste regioni di infezioni continue e intense ha rappresentato la pressione selettiva per lo sviluppo di resistenze. Ipotesi di co-evoluzione sono già state riportate in letteratura per le specie selvatiche di patata *S. bulbocastanum* e *S. chardiophyllum* nei confronti della peronospora (Aversano et al., 2007).

La variabilità dei livelli di resistenza riportati tra i cloni delle specie *S. bulbocastanum* (BLB1C, BLB2C e PT29) e *S. chacoense* (CHC1A e CHC1B), in cui sono presenti accessioni suscettibili (BLB1C) e resistenti (BLB2C e PT29) in un caso e suscettibili (CHC1B) e mediamente resistenti (CHC1A) nell'altro, non deve meravigliare in quanto è noto che la resistenza a *R. solanacearum* può variare in base all'aumento o alla diminuzione della temperatura (van der Wolf e De Boer, 2007). E', quindi, possibile che tali accessioni abbiano risposto in modo differente in base alle condizioni ambientali. La presenza di cloni resistenti e suscettibili nell'ambito della specie *S. bulbocastanum*, inoltre, è stata anche riscontrata da Aversano et al. (2007) nei confronti però di un altro batterio, quale *Erwinia carotovora*.

Ad oggi in letteratura non sono riportate resistenze a *R. solanacearum* per i cloni delle specie selvatiche risultate resistenti e mediamente resistenti in questo studio. Ad eccezione di *S. commersonii* il cui clone è già stato riportato resistente da Carputo et al. (2009) nei confronti della stessa razza e biovar usata nella presente attività di ricerca.

In aggiunta ai test di sensibilità e ai saggi di piastratura su terreno selettivo, anche le amplificazioni con *primer* specifici per *R. solanacearum*, condotti sui genotipi resistenti a 30 giorni dall'inoculo, hanno mostrato la presenza del batterio negli estratti provenienti dalla

porzione radicale e l'assenza dello stesso negli estratti della porzione apicale. I meccanismi d'interazione gene-pianta-patogeno nel sistema *R. solanacearum*-patata sono ancora oscuri. In pomodoro Wydra e Beri (2007) suggeriscono che la struttura della parete cellulare dello xilema giochi un ruolo fondamentale nei meccanismi di resistenza. In *A. thaliana*, Yang e Ho (1998) riportano che la pianta ha la capacità di agire sulla crescita e sul movimento del batterio. I risultati ottenuti in questo studio fanno ipotizzare che le piante fenotipicamente resistenti siano comunque invase dal batterio, ma con il passare del tempo riescano a ridurre la carica batterica tanto da non ottenere più la crescita su piastre selettive né amplificato PCR dagli estratti della porzione apicale. Ciò fa pensare che nelle piante si attivino meccanismi che ostacolano la moltiplicazione del batterio stesso, o il passaggio attraverso il sistema vascolare alle porzioni apicali della pianta. Bisogna però considerare che la presenza di radici colonizzate dal batterio potrebbe costituire comunque un problema, in quanto possono veicolarlo in campi incontaminati. Ulteriori studi saranno, quindi, necessari per approfondire tali conoscenze.

I 21 cloni di specie selvatiche sono stati valutati per la resistenza a PVY. Tra le patologie virali che colpiscono la patata, infatti, il virus Y comporta ancora i maggiori problemi di produzione nei climi temperati (Gebhardt e Valkonen, 2001). La ricerca di genotipi resistenti tra le specie selvatiche utilizzate in questa attività, attraverso saggi immunoenzimatici ELISA e analisi molecolari, ha portato all'identificazione di ben quattro cloni resistenti, ovvero BLB1C (*S. bulbocastanum*), ETB3 (*S. etuberosum*), CPH1C (*S. cardiophyllum*) e IVP35 (*S. phureja*); e di due mediamente resistenti, PT29 (*S. bulbocastanum*) e CHC1A (*S. chacoense*). Ad eccezione di *S. etuberosum*, per la quale è stata valutata un'unica accessione, per le altre specie selvatiche nell'ambito della stessa specie vi sono cloni resistenti, mediamente resistenti e suscettibili. Ne sono un tipico esempio le tre accessioni di *S. bulbocastanum* che presentano entrambi i livelli di resistenza e anche il fenotipo suscettibile (BLB1C resistente, BLB2C suscettibile e PT29 mediamente resistente) o le accessioni di *S. cardiophyllum* e *S. phureja* di cui una resistente (CPH1C, IVP35) e una suscettibile (CPH2A, IVP101). In accordo con quanto riportato da Jansky et al. (2008) la resistenza non è specie-specifica. Infatti, nell'ambito delle specie è comune avere un'ampia variabilità in termini di resistenze tra ed entro le accessioni. Ciò non deve sorprendere dato che queste specie derivano da incroci da genotipi altamente eterozigoti. E' interessante notare, inoltre, che tutte le specie resistenti, ad eccezione di *S. phureja*, presentano allo stadio diploide EBN pari a 1, mentre le mediamente resistenti hanno EBN uguale 1 (PT29) e 2 (CHC1A). Jansky et al. (2008) hanno riportato che le specie maggiormente resistenti alla peronospora hanno EBN pari a 1 mentre tutte le altre hanno EBN 2 o 4. Inoltre, così come riscontrato per i genotipi resistenti a *R. solanacearum*, i genotipi resistenti e

mediamente resistenti a PVY sono originari del Messico l'unica eccezione è rappresentata da *S. phureja*. In accordo con quanto sottolineato da Jansky et al. (2008) ci può essere un filo conduttore che lega origine geografica, ploidia e resistenza e potrebbe essere possibile predire la presenza di resistenze in specie simili. Esiste, tuttavia, grossa variabilità entro questi parametri e queste specie.

In letteratura è riportata la presenza di accessioni estremamente resistenti a PVY in *S. cardiophyllum* (Thieme et al., 2010). Gli autori hanno trasferito tale resistenza in ibridi somatici prodotti con cultivar commerciali di patata. Aversano et al. (2007), inoltre, riportano resistenze multiple nell'accessione 1C e 2D di *S. cardiophyllum* nei confronti di *P. infestans* e *G. rostochiensis*; e nell'accessione 2C nei confronti di *E. carotovora* e *G. rostochiensis*. Tali dati supportano le potenzialità dell'accessione 1C di *S. cardiophyllum*, la quale anche in tale ricerca è risultata resistente a PVY. Questa specie, per le resistenze riscontrate, potrà essere molto utile nei programmi di miglioramento genetico.

Le specie selvatiche *S. bulbocastanum*, *S. cardiophyllum*, *S. commersonii*, *S. fendleri*, *S. multidissectum*, *S. phureja* e *S. stoloniferum* hanno presentato l'amplificato di 321 basi corrispondente ad una regione (ADG2) strettamente associata al gene *Ry_{adg}* identificato in *S. tuberosum* subsp. *andigena* che conferisce estrema resistenza a PVY (Kasai et al., 2000). Nei saggi PCR effettuati, delle specie sopra riportate solo *S. bulbocastanum*, ha presentato accessioni resistenti, mediamente resistenti e suscettibili e *S. cardiophyllum*, e *S. phureja* hanno presentano accessioni resistenti o suscettibili. Le rimanenti specie hanno riportato esclusivamente accessioni suscettibili pur presentando l'amplificato da 321 basi. Ciò potrebbe essere indicazione della presenza di una copia non sempre attiva del gene *Ry_{adg}*. Kasai et al. (2000) hanno riportato, inoltre, l'elevata specificità dei marcatori SCAR RYSC3 (utilizzati in questo studio) nell'identificare esclusivamente i genotipi aventi il gene *Ry_{adg}*. Gli autori hanno riportato che tali marcatori non sono in grado di amplificare geni *Ry* (di resistenza a PVY) che non derivino da *S. tuberosum* subsp. *andigena*. Tale evidenza potrebbe indicare che nelle specie risultate resistenti, come *S. etuberosum* o *S. chacoense*, in cui non è stato riscontrato alcun amplificato del gene *Ry_{adg}* vi possa essere un gene di resistenza a PVY non ancora identificato oppure un omologo di un altro gene di resistenza *Ry*. Ad oggi è nota la presenza del gene *Ry_{sto}* nella specie selvatica *S. stoloniferum* (Song e Schwarzfischer, 2008). La somiglianza tra i geni *Ry_{adg}* e *Ry_{sto}* non è stata ancora studiata. Tale indagine sarebbe interessante in quanto, dalla presente attività di ricerca, è emerso che le accessioni di *S. stoloniferum* analizzate con i marcatori SCAR RYSC3, presentano un amplificato presumibilmente attribuibile a *Ry_{adg}*. Ulteriori approfondimenti su tali dati potrebbero confutare la tesi di Kasai et al. (2000) secondo

cui i marcatori SCAR RYSC3 amplificano esclusivamente geni *Ry* che provengano da *S. tuberosum* subsp. *andigena*, oppure porre nuova luce sulla somiglianza esistente tra i geni *Ry_{adg}* e *Ry_{sto}*. I risultati ottenuti in questo studio con i marcatori SCAR RYSC3, quindi, non sono in completo accordo con quanto riportato da Kasai et al. (2000) che, con tali marcatori sono riusciti a differenziare i genotipi resistenti dai suscettibili. Ulteriori indagini di sequenziamento e clonaggio di questa regione saranno utili per chiarire la sua implicazione nella resistenza.

In questo studio nei cloni PT29, ETB3 e CHC1A delle specie selvatiche *S. bulbocastanum*, *S. etuberosum* e *S. chacoense* rispettivamente, sono state individuate resistenze multiple nei confronti di *R. solanacearum* e PVY. L'accessione PT29, infatti, risulta essere resistente a *R. solanacearum* e mediamente resistente a PVY; ETB3 risulta essere mediamente resistente a *R. solanacearum* e resistente a PVY; CHC1A risulta mediamente resistente a entrambi. *S. bulbocastanum* e *S. etuberosum* sembrano specie selvatiche piuttosto promettenti per il trasferimento di resistenze alla patata coltivata nei programmi di *breeding*. I tre cloni di *S. bulbocastanum* testati presentano resistenze con grado variabile nei confronti di entrambi i patogeni. Resistenze multiple nelle accessioni 1C e 2C di *S. bulbocastanum*, che in questo studio sono risultate resistenti a PVY e *R. solanacearum* rispettivamente, sono state individuate anche da Aversano et al. (2007) nei confronti però di *P. infestans* e *G. rostochiensis*. Gli autori hanno riscontrato la presenza di resistenze multiple in altri cloni della stessa specie nei confronti di *P. infestans*, *Fusarium solani*, *E. carotovora* e *G. rostochiensis*. *S. bulbocastanum*, inoltre, è già ampiamente nota per la resistenza alla peronospora (van der Vossen et al., 2003; van der Vossen et al., 2005). Infine, il clone ETB3 della specie selvatica *S. etuberosum* (resistente a PVY e mediamente resistente a *R. solanacearum*) è molto interessante per i caratteri di resistenza mostrati ma ancora poco conosciuta. Oltre alle resistenze individuate in questo studio, Wang et al. (2008) hanno identificato in questa specie selvatica omologhi del gene *RGAI-blb* di resistenza a *P. infestans*.

Alla luce dei risultati ottenuti il materiale oggetto di studio potrebbe essere utilizzato per approfondire le conoscenze sui meccanismi di risposta della pianta al patogeno nonché rappresentare un'importante risorsa genetica per l'introgressione dei caratteri di resistenza. I geni o i QTL responsabili delle resistenze studiate, potrebbero essere trasferiti in varietà coltivate mediante strategie convenzionali (ibridazione sessuale) o tramite approcci innovativi (ibridazione somatica o trasformazione genetica). L'ibridazione sessuale comporta la necessità di effettuare incroci e selezione per più generazioni, inoltre, non sempre è attuabile date le barriere di incompatibilità. La maggioranza delle specie selvatiche che in questa attività di ricerca hanno presentato caratteri di resistenza interessanti, hanno valori di EBN pari a 1. Il

trasferimento delle resistenze da queste specie alla patata coltivata, quindi, non è facilmente attuabile con i metodi classici soprattutto a causa dei diversi valori di EBN. Tale problematica può essere superata attraverso la messa in atto di strategie di ingegneria genetica che prevedono manipolazioni della ploidia, incroci ponte, fusione somatica ecc. In questo studio sono state individuate però, anche specie con EBN 2 resistenti a PVY (*S. phureja* clone IVP35) e mediamente resistenti a *R. solanacearum* e PVY (*S. chacoense* colone CHC1A), incrociabili con *S. tuberosum* attraverso i metodi classici.

Una volta identificati e trasferiti i geni di resistenza, la selezione fenotipica per tali caratteri comporta costi elevati e tempi lunghi. Tempi che possono essere notevolmente ridotti grazie alla presenza di marcatori molecolari associati ai geni d'interesse. I marcatori molecolari riducono la necessità di effettuare test di resistenza su larga scala e sono stati ampiamente usati in patata per localizzare fattori associati alla resistenza a numerose patologie (Gebhardt e Valkonen, 2001). I marcatori molecolari sono utili, infatti, per monitorare l'introggressione di geni d'interesse dalla specie selvatica a quella coltivata, per la selezione assistita positiva e negativa e per comprendere le origini e le relazioni genetiche esistenti tra i caratteri di resistenza e le specie. L'uso delle specie selvatiche però comporta uno svantaggio rappresentato dal cosiddetto *linkage drag*, ovvero la riduzione della *fitness* in una nuova varietà dovuta alla introggressione di geni deleteri insieme ai geni benefici durante gli incroci. Anche tale inconveniente può essere superato con l'uso dei marcatori molecolari, i quali consentono di studiare la variabilità genetica direttamente a livello del DNA ed operare una selezione assistita per i caratteri di interesse, permettendo di scartare gli individui con caratteristiche negative senza influenzare i caratteri desiderati.

In questo studio 12 marcatori molecolari SSR sono stati usati per sviluppare nuovi strumenti genomici che consentano un'efficiente utilizzazione dell'ampia biodiversità presente nelle specie selvatiche di patata sopra descritte, caratterizzate per aspetti relativi alla resistenza e utilizzate in programmi di miglioramento genetico presso il DiSSPAPA. Tali marcatori hanno consentito di valutare la variabilità genetica e si sono mostrati potenzialmente utili in studi di selezione assistita. L'uso dei marcatori molecolari SSR non è nuovo in patata; essi, infatti, sono stati ampiamente usati per studi di diversità genetica, *fingerprinting* molecolare, classificazione e identificazione varietale (Moisan-Thiery et al. 2005; Spooner et al., 2007). In particolare, i marcatori molecolari SSR utilizzati nella presente attività di ricerca hanno consentito di valutare differenze e similitudini molecolari esistenti tra le specie selvatiche già analizzate per la resistenza. L'utilizzo dei marcatori molecolari SSR per stimare le relazioni genetiche esistenti tra le accessioni e la loro associazione ai tratti di resistenza è ampiamente riportato non solo in

patata ma anche in altre specie. In frumento, ad esempio, i marcatori molecolari SSR sono stati utilizzati da Badea et al. (2008) per stimare le relazioni genetiche esistenti tra le linee di frumento utilizzate. Inoltre, gli autori hanno mostrato che l'uso combinato di tali marcatori con i QTL o altri marcatori come i DArT sia utile anche per l'identificazione di nuove fonti di resistenza.

L'uso dei 12 marcatori SSR ha permesso di valutare il livello di polimorfismo esistente tra i 45 genotipi selvatici e coltivati, che è risultato in accordo con quello ottenuto da Ghislain et al. (2009). Questi autori, infatti, con un numero di marcatori circa 10 volte superiore a quello utilizzato nel presente studio, hanno evidenziato in 30 cultivar di patata, valori di PIC pari a 0.81 e di 6.8 per il numero di bande osservate per marcatore SSR. Valori più variabili, invece, sono riportati da Ashkenazi et al. (2001).

I risultati ottenuti con i marcatori molecolari SSR hanno consentito di approfondire le conoscenze sulle relazioni tassonomiche esistenti tra le specie selvatiche e le varietà coltivate. Sono stati distinti due principali *Cluster* genetici. Il *cluster* 1, che raggruppa le specie selvatiche e il *cluster* 2, che raggruppa le varietà coltivate. Nell'ambito del *cluster* 1 non ci sono state particolari correlazioni tra le specie risultate resistenti a *R. solanacearum* e a PVY. Hanno fatto eccezione di *S. bulbocastanum*, *S. cardiophyllum* e *S. etuberosum*, che tra tutte le specie selvatiche sono apparse le più vicine dal punto di vista filogenetico. Esse sono originarie del Messico e presentano resistenze multiple nei confronti di tali patogeni e di *P. infestans* e *G. rostochiensis* (Aversano et al., 2007; Wang et al., 2008). Tali dati confermano ulteriormente il concetto riportato da Chung et al. (2010) secondo cui relazioni tassonomiche e geografiche consentono di predire caratteri di resistenza simili tra le specie vegetali. La localizzazione di *S. bulbocastanum* e *S. cardiophyllum* in un gruppo filogeneticamente correlato è in accordo con quanto riscontrato da Spooner e Castillo (1997). Essi, con marcatori RFLP identificati sul genoma cloroplastico di un esteso numero di specie di patata, hanno ottenuto un albero filogenetico che raggruppa le specie in quattro gruppi tassonomici. Uno di questi gruppi è costituito da *S. bulbocastanum* e *S. cardiophyllum*. Gli autori, inoltre, hanno associato in un altro gruppo tassonomico le specie *S. multidissectum* con *S. cananense*, *S. chacoense* con *S. commersonii* e *S. tuberosum* con *S. acaule*. Nel presente studio con i marcatori SSR non è stato possibile confermare l'associazione tassonomica di queste specie. Molto probabilmente per il diverso tipo di marcatore molecolare utilizzato e soprattutto per la diversa natura e consistenza del materiale genetico di partenza. Ulteriori studi di sequenziamento e analisi di sequenze saranno utili per valutare l'associazione di questi marcatori alle resistenze nei confronti di *R. solanacearum* e PVY individuate in alcune specie selvatiche.

La distanza filogenetica osservata in alcune accessioni della stessa specie, ad esempio le accessioni FEN2B e FEN 1B di *S. fendleri*, e l'interposizione tra di esse di altre specie selvatiche (come l'accessione CMM1T di *S. commersonii*), potrebbe essere un'indicazione della presenza di alcuni caratteri in comune tra le stesse, nonostante i diversi centri di origine e l'appartenenza a diverse specie. Similitudini esistenti tra diverse specie selvatiche, sono già riportate da Chung et al. (2011) e Bradshaw et al. (2006). Tale distanza filogenetica è, inoltre, un'ulteriore conferma della presenza di un'ampia variabilità genetica tra le accessioni della stessa specie. In accordo con quanto riportato da Jansky et al. (2009), infatti, esse derivano da genotipi altamente eterozigoti. Tra le specie selvatiche i cloni TAR2B di *S. tarijense* e IVP101 di *S. phureja* sono quelli più vicini al *cluster* 2, che contiene le specie coltivate. Ciò non deve meravigliare in quanto è noto che la patata coltivata è originata da specie selvatiche (Spooner et al., 2005). Nel caso di *S. phureja*, inoltre, è nota la vicinanza con *S. tuberosum* tanto che questa specie è considerata una cultivar di *S. tuberosum* (Huamàn e Spooner, 2002; Ghislain et al., 2006). Nel *cluster* 2 tra le cultivar di *S. tuberosum*, Blondy è la più vicina alle specie selvatiche e non è raggruppata con tutte le altre. Essa, infatti, tra parentali presenta la specie selvatica *S. vernei*. Inoltre, il fatto che Blondy sia sola non deve meravigliare, in quanto con analisi SSR la presenza di cultivar isolate è stata riscontrata anche in frumento da Bai et al. (2003) e Badea et al. (2008). Nel complesso le analisi tassonomiche condotte hanno consentito di identificare i *cluster* genetici attesi in base alle conoscenze preliminari sulla natura delle specie e delle varietà utilizzate. Ciò conferma le potenzialità degli strumenti genomici SSR per studi genetici di popolazione e filogenesi molecolare (Ghislain et al. 2004).

L'uso delle specie selvatiche negli schemi di miglioramento genetico comporta la trasmissione nel *gene pool* coltivato, oltre che di geni d'interesse, anche di regioni che contengono geni indesiderati. Questa rappresenta la problematica principale che nel tempo ha limitato l'uso delle specie selvatiche, nonostante tutti i geni di resistenza a stress biotici e abiotici e i caratteri associati alla qualità e alla produttività in esse contenuti (Pavek e Corsini 2001). I marcatori molecolari possono contribuire a risolvere questo problema, sia se strettamente associati ai geni di interesse che non associati ad essi. In quest'ultimo caso è possibile usare marcatori specifici della specie selvatica, definiti alleli privati, che consentano di selezionare rapidamente i genotipi che contengono il maggior numero di caratteristiche positive della specie selvatica e la maggiore quantità di genoma coltivato, e al contempo il minor contenuto di alleli privati, ovvero di genoma selvatico. L'identificazione di alleli privati nelle specie selvatiche, ad esempio tramite SSR, è quindi, di fondamentale importanza per studi di selezione assistita negativa. Un esempio dell'utilità della selezione negativa assistita da

marcatori molecolari è fornito da Iovene et al. (2004). Gli autori hanno utilizzato marcatori AFLP, specifici della specie selvatica *S. commersonii*, per monitorare la quantità di genoma selvatico presente in ibridi ottenuti tra *S. commersonii* e *S. tuberosum*. Tali marcatori hanno consentito di selezionare i genotipi ibridi che contengono i caratteri d'interesse di *S. commersonii* e il minor contenuto di genoma selvatico; *S. commersonii* può essere portatore di caratteri negativi come alto contenuto in glicoalcaloidi, stoloni lunghi e perdita di adattamento a condizioni di giorno lungo (Iovene et al., 2004). L'importanza degli alleli privati come misura della diversità genetica presente tra le popolazioni è ampiamente riportata da Kalinowski (2004). La diversità genetica tra le popolazioni è un parametro fondamentale in studi di biologia evolutiva. Elevati livelli di variabilità genetica sono necessari per aumentare la capacità delle popolazioni di rispondere alla selezione naturale e per mantenere un buono stato di salute negli individui a seguito dei cambiamenti ambientali. Kalinowski (2004) afferma, inoltre, che la presenza di alleli privati individuati tramite marcatori molecolari SSR è fortemente influenzata dalla grandezza del marcatore e dalla distanza genetica delle popolazioni campionate; grossi campioni presentano più alleli privati rispetto a campioni ristretti.

L'attività di ricerca riportata in questo capitolo ha messo in luce la presenza di numerosi marcatori SSR privati, specifici di alcune o tutte le specie selvatiche e assenti in alcune o tutte le varietà coltivate analizzate. Non è stata per ora riscontrata nessuna associazione tra questi alleli e i tratti di resistenza analizzati. Saranno perciò necessari ulteriori approfondimenti per identificare tali associazioni. Gli alleli privati individuati potranno essere utili per la selezione assistita negativa, nonché nella scelta delle migliori combinazioni di incrocio specie selvatica-varietà coltivata. Inoltre, i marcatori SSR, in associazione con altri marcatori potranno essere usati per il mappaggio dei geni di resistenza. Singh et al. (2009) hanno riportato l'utilizzo combinato dei marcatori SSR con i marcatori DArT e hanno confermato la loro utilità per il mappaggio di geni di resistenza a *Pyrenophora tritici-repentis* in frumento.

I risultati ottenuti in questo studio forniscono informazioni aggiuntive sulle specie selvatiche analizzate, aumentando le conoscenze ad esse associate e la loro potenziale utilità nei programmi di miglioramento genetico. Inoltre, la caratterizzazione molecolare effettuata ha portato all'identificazione di marcatori SSR specie-specifici che potranno essere usati nella selezione assistita negativa, ad esempio per la selezione di ibridi interspecifici che posseggono i caratteri di resistenza senza *linkage drag*. Avere questi marcatori specie-specifici è molto importante nel momento in cui si decide di mettere a punto strategie per la selezione assistita. Ciò potrà consentire di aumentare notevolmente l'efficienza dei programmi di *breeding* e di ridurre i tempi necessari per lo sviluppo di varietà resistenti.

Capitolo 3

3.1 Introduzione

La crescente quantità di informazioni prodotte sperimentalmente dagli studi genetico molecolari attraverso le nuove tecnologie, ha reso necessario lo sviluppo di un approccio che consenta di analizzare, organizzare, catalogare e integrare i dati, in modo da poter ricavare tutte le informazioni in essi contenute e renderli fruibili a tutta la comunità scientifica. E' nata così la bioinformatica, ovvero la disciplina idonea all'adeguata gestione di questa grossa quantità di dati, nonché l'approccio necessario per l'interpretazione dei dati grezzi in essi contenuti e per la loro conversione in informazioni biologicamente significative. Gli approcci di tipo bioinformatico sono gli unici che consentono l'analisi di quantità di dati cospicui ed eterogenei come, ad esempio, quelli prodotti mediante analisi microarray, mappe genetiche, marcatori molecolari e sequenziamento (Chiusano et al., 2009). Essi, inoltre, consentono di identificare caratteristiche strutturali utili a comprendere i processi molecolari che determinano la variabilità fenotipica degli organismi e le loro complesse funzionalità.

Dalla sua nascita verso la fine degli anni '70, avvenuta in concomitanza con lo sviluppo delle tecnologie del DNA ricombinante e la pubblicazione delle prime sequenze, fino ad oggi la bioinformatica è stata utilizzata per vari scopi tra cui l'identificazione delle caratteristiche strutturali e funzionali di sequenze biologiche e la ricostruzione delle tappe evolutive delle varie specie. Le sequenze biologiche, infatti, si prestano bene alla decodifica in algoritmi informatici; d'altra parte, lo sviluppo tecnologico ha consentito l'archiviazione di grosse quantità di dati nonché la diffusione degli stessi attraverso le vie telematiche (Valle et al., 2003).

E' in questo scenario di evoluzione biotecnologica che la bioinformatica trova sempre più applicazione nella gestione e catalogazione delle informazioni in banche dati biologiche, nell'allineamento di sequenze di acidi nucleici e proteine, nell'allineamento multiplo di sequenze, nella costruzione di alberi filogenetici, nella previsione di strutture e motivi funzionali, in studi di evoluzione molecolare, nel sequenziamento e nell'analisi di genomi, nonché nella genomica funzionale (Mochida e Shinozaki, 2010). Nonostante le varie applicazioni bioinformatiche disponibili, per l'attività di ricerca riportata in questo capitolo di tesi, gli strumenti più utilizzati sono stati quelli riguardanti l'allineamento di sequenze, le banche dati e,

soprattutto, quelli ricadenti nell'ambito della genomica, sequenziamento ed analisi dei genomi. Nei prossimi paragrafi saranno approfonditi questi interessanti aspetti.

3.1.1 Sequenziamento e analisi dei genomi

Negli ultimi anni gli avanzamenti strumentali e metodici della biologia molecolare hanno fatto sì che il sequenziamento del DNA sia sempre più efficiente e raffinato. La varietà e la quantità dei dati ottenuti da queste ricerche non hanno precedenti. La determinazione della sequenza di un genoma non consente di capire immediatamente il programma genetico e il significato dell'informazione che esso racchiude; è possibile capire solo parzialmente e approssimativamente gli elementi funzionali in esso contenuti. Il sequenziamento di genomi, soprattutto di quelli eucariotici, è ancora un'impresa relativamente ardua. Per i genomi procariotici ormai la strategia seguita è quella di tipo “*shotgun*”, che prevede il sequenziamento di frammenti genomici da assemblare in contig per formare una sequenza consensus e creare una mappa fisica che consenta di posizionare adeguatamente i vari frammenti genomici. A causa della maggiore estensione del genoma degli eucarioti, la complessità nel sequenziamento aumenta. Le strategie di sequenziamento adottate, quindi, passano attraverso la costruzione di una libreria BAC e il sequenziamento di ogni BAC con approccio “*shotgun*”. L'altra strategia consiste nel produrre prima le sequenze all'estremità della libreria BAC e poi procedere al sequenziamento dei BAC; successivamente si passa alla sovrapposizione dei BAC paragonando le estremità e muovendosi così lungo il genoma. Ovviamente l'eventuale presenza di mappe genetiche consente di facilitare notevolmente l'assemblaggio della sequenza. Una tecnologia più evoluta adottata negli ultimi anni per il sequenziamento dei genomi è la “*Next Generation Sequencing*” (NGS), che ha sostituito i metodi di sequenziamento basati sulla tecnologia di Sanger e che trova applicazione in vari contesti tra cui il “*whole-genome sequencing*”. Tale tecnologia è stata usata per produrre dati di sequenza per oltre 1000 progetti genoma. Essa prevede il rapido sviluppo di frammenti di sequenza molto corti da assemblare insieme mediante l'uso di algoritmi bioinformatici. La NGS consente di accelerare notevolmente l'analisi e di conseguenza la comprensione dei genomi e dei trascrittomi. Lo sviluppo della NGS è stato reso possibile soprattutto grazie ai progressi tecnologici e alla notevole riduzione dei costi di sequenziamento (Shendure e Ji, 2008). Ad oggi sono tre le principali tecnologie disponibili in commercio per il NGS ovvero 454/Roche, ABI/Solid e Illumina/Solexa (Morozova e Marra, 2008).

3.1.2 Genomica e genomica funzionale

I sequenziamenti su larga scala hanno determinato una rapida crescita nel campo della ricerca “genomica” che non è più limitata alla sola determinazione delle sequenze, ma si estende anche allo studio dell’espressione e funzione di geni e proteine. La scienza del genoma ha assunto, quindi, un significato più ampio, comprendendo lo studio della struttura, del contenuto e dell’evoluzione dei genomi, con un collegamento sempre più stretto con la bioinformatica (Gibson e Muse, 2004). La genomica funzionale nasce dalle ricerche genomiche che hanno portato alla scoperta di numerosi geni e ha l’obiettivo di raccogliere i dati che consentono di definire la funzione dei geni e delle proteine ad essi associati. Per poter avere una visione d’insieme sulla funzione di più geni è necessario partire dall’analisi di strutture più piccole, come ad esempio porzioni geniche o singole sequenze geniche. Quindi, per la giusta interpretazione dei dati genomici, è spesso necessaria l’analisi di sequenze singole mediante analisi degli allineamenti.

L’allineamento ha lo scopo di confrontare le sequenze per ricerche di similarità, per la costruzione di alberi filogenetici o per l’identificazione di domini funzionali. L’allineamento dovrebbe portare all’appaiamento delle regioni simili condivise dalle due sequenze; per raggiungere questo scopo bisogna considerare la possibilità dell’inserimento di interruzioni (inserzioni o delezioni) nelle stesse. Ovviamente un buon allineamento è dato dal maggior numero di simboli (residui nucleotidici o amminoacidici) simili e del minor numero di inserzioni e delezioni. L’allineamento di sequenze può dare indicazioni di zone conservate in cui i residui sono ben appaiati o di zone più variabili in cui i residui non sono appaiati e che probabilmente sono state sottoposte a pressione selettiva. Esistono due tipi di allineamenti: i) quello globale ovvero sull’intera sequenza e ii) quello locale in cui il confronto avviene localmente segmento per segmento. L’allineamento locale rispetto a quello globale consente di individuare domini conservati, ad esempio, all’interno di sequenze provenienti da specie molto distanti, fornendo anche informazioni sulla divergenza genica di quest’ultime. L’allineamento di una sequenza in banca dati può consentire di recuperare rapidamente le sequenze ad essa simili e quindi di risalire alla funzione. Un programma elaborato per la rapida ricerca in banca dati è il BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Ad esempio quello fornito dal NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), valuta le somiglianze locali della sequenza data con quelle presenti in banca dati e ci restituisce gli allineamenti con il punteggio migliore. Sono state sviluppate diverse versioni del programma BLAST (ad esempio blastn, blastp, blastx ecc.), che consentono il confronto sia di sequenze di acidi nucleici che di proteine (Johnson et al., 2008).

Nonostante il programma più diffuso per l'allineamento di sequenze sia il BLAST, in questa tesi di ricerca è stato utilizzato il programma GenomeThreader (Gremme et al., 2005), utile anche per la previsione della struttura genica. Esso, tenendo conto della struttura esoni-introni, ricerca il migliore allineamento della sequenza data al DNA di riferimento. La scelta è caduta su tale programma in quanto è caratterizzato da una buona velocità di esecuzione, dalla produzione di un numero molto ridotto di falsi positivi e soprattutto dall'abilità di allineare in modo corretto anche piccole sequenze con ottimi risultati di copertura e identità nucleotidica.

Per la caratterizzazione funzionale delle sequenze nucleotidiche e proteiche l'allineamento comparativo multiplo è l'approccio più rilevante in quanto fornisce anche informazioni di tipo evolutivo sulle zone maggiormente conservate, fino alla definizione dell'omologia, ovvero la presenza di un progenitore comune tra le sequenze. Il programma più diffuso per l'allineamento multiplo è Clustal W. Data la crescente quantità di sequenze e di studi funzionali ad esse associati, si è sentita sempre più la necessità di raccogliarli e catalogarli in banche dati di facile accesso che ne consentano l'analisi e l'utilizzo.

Le banche dati biologiche hanno lo scopo di conservare e distribuire tutte le informazioni connesse all'acquisizione del dato. Nel 1977 fu sviluppato il sistema MEDLARS, la prima banca dati in grado di essere interrogata da qualunque ricercatore che disponesse di un modem o telex. Successivamente nacquero le banche dati di acidi nucleici tuttora in uso, quali quella europea dell'EMBL (European Molecular Biology Laboratory in Germania <http://www.embl.de>), la banca dati Americana *GeneBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e la banca dati Giapponese DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html>). Le principali banche dati di sequenze proteiche sono invece SWISSPROT (<http://web.expasy.org>), TREMBL (<http://www.ebi.ac.uk>) e PIR (<http://pir.georgetown.edu/>). La disponibilità crescente di informazioni associate alle sequenze ha condotto allo sviluppo delle prime banche dati specializzate che collezionano i dati biologici sulla base di specifici criteri. Tra i database specializzati accessibili in rete ci sono quelli di enzimi di restrizione (REBASE), di sequenze ripetute (REPBASE), di famiglie proteiche (Pfam), di geni noti su genomi completi di procarioti ed eucarioti (GENES), di fattori trascrizionali (TRANSFAC) di sequenze espresse per i diversi organismi animali e vegetali, sia eucariotici che procariotici. In particolare, per la famiglia delle *Solanaceae*, sono disponibili diverse banche dati, che raccolgono informazioni su sequenze espresse di alcune specie appartenenti a questa famiglia, utili per studi di genomica comparativa. Tra queste c'è la banca dati disponibile presso il sol genomic network (<http://solgenomics.net/>), facente parte dell'International *Solanaceae* Initiative (SOL). Esso fornisce numerosi strumenti per l'analisi del genoma delle *Solanaceae*,

tra cui una collezione di EST utile per mettere a punto strategie di clonaggio e per studi di sintenia e microarray. Il database SOLEST (<http://biosrv.cab.unina.it/solestdb>), invece, è stato sviluppato presso l'Università di Napoli Federico II nell'ambito del progetto internazionale di sequenziamento del genoma di pomodoro. Ha lo scopo di produrre una risorsa utile per studi di espressione e di identificazione genica. A partire dalle informazioni note su sequenze espresse (EST o geni) e sulla funzione delle stesse, sono nate banche dati specializzate che raccolgono geni accomunati dall'avere funzioni analoghe; tra di esse c'è la banca dati "*Plant Resistance Genes Database*" (<http://prgdb.cbm.fvg.it/>). Questa è la prima banca che raccoglie i geni di resistenza e i putativi geni di resistenza noti in pianta (R-genes). Tali geni hanno un ruolo chiave nel riconoscimento del patogeno e nell'attivazione dei processi di resistenza. Il "*Plant Resistance Genes Database*" li rende disponibili alla comunità scientifica per gli studi associati alla resistenza a malattie (Sanseverino et al., 2009). Attraverso un'interfaccia web, di facile consultazione, fornisce informazioni relative alla struttura genica, all'organizzazione dei domini funzionali del gene di resistenza, nonché all'organismo in cui è stato studiato e al tipo di patologia associata, con le relative referenze bibliografiche e le informazioni di sequenza nucleotidiche e proteiche. Nell'era della genomica di grande importanza divengono anche le banche dati che contengono le risorse relative al sequenziamento dei genomi, come la Entrez Genomes creata dall'NCBI (National Center for Biotechnology Information). Con l'evoluzione dei progetti genomici e lo sviluppo della tecnologia dei microarray, infine, si stanno diffondendo le banche dati che raggruppano i dati biologici in -omici, consentendo di avere una visione più ampia e a più livelli della funzione e organizzazione delle sequenze ottenute per un organismo (Pascarella, 2010).

3.1.3 Analisi dei genomi sequenziati

Negli ultimi anni si è arrivati al sequenziamento completo del genoma (sia nucleare che di organelli) di molti organismi, fornendo così il più grande apporto di dati biologici a supporto della bioinformatica. Tra i procarioti sono ormai centinaia le sequenze genomiche completate e disponibili. Negli eucarioti è stato completato prima il genoma del lievito (Mewes et al., 1997), successivamente quello del nematode *Caenorhabditis elegans* (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998).

Nel regno vegetale, grazie al crescente sviluppo delle metodologie di sequenziamento, sono stati completati i genomi di numerosi organismi tra cui per primo il genoma di *Arabidopsis thaliana* (AGI, 2000), successivamente il genoma del riso (Yu et al., 2002; Goff et al., 2002),

del pioppo (Tuscan et al., 2006), della vite (Jaillon et al., 2007), della soia (Paterson et al., 2009), del mais (Schnable et al., 2009) e del melo (Velasco et al., 2010). Nell'ambito delle famiglie delle *Solanaceae* di grande importanza è stato il sequenziamento del genoma di patata (Potato Genome Sequencing Consortium, 2011) e pomodoro (Mueller et al., 2009).

Il sequenziamento dell'86% del genoma di patata è stato completato nel 2011 dal Potato Genome Sequencing Consortium sull'omozigote (doppio monoploide) di patata *S. phureja* DM1-3 516 R44 (DM), al fine di superare il problema dell'elevata eterozigosità della patata e generare una sequenza genomica di elevata qualità. La sequenza del doppio monoploide è stata usata per integrare i dati di sequenza dell'eterozigote diploide *S. tuberosum* RH89-039-16 (RH). Questi due genotipi sono rappresentativi della diversità del genoma di patata. L'approccio usato per ottenere le sequenze del genoma nucleare e degli organelli di DM è stato il *whole-genome shotgun*, che ha previsto il sequenziamento di frammenti genomici poi assemblati in contig a formare una sequenza consensus. La sequenza genomica è risultata di 727 Mb, di cui il 94% privo di interruzioni, e con solo 117 Mb in meno rispetto alla grandezza stimata. La sequenza presenta il 62% di sequenze ripetute, il 29% di elementi trasponibili e, grazie ai sistemi di predizione genica e agli allineamenti con le EST, sono stati annotati circa 39.000 geni codificanti proteine. Le regioni eterocromatiche sono state localizzate a livello pericentromerico. Infine, le mappe genetiche e fisiche disponibili hanno consentito l'ancoraggio di 623 Mb (86%) del genoma, consentendo di costruire le pseudomolecole per ognuno dei 12 cromosomi (Potato Genome Sequencing Consortium, 2011).

I risultati del progetto di sequenziamento del genoma del pomodoro (*S. lycopersicum* cv. Heinz 1706) è in corso di pubblicazione. Il genoma è organizzato in 12 cromosomi ed è costituito in gran parte da eterocromatina che è ricca in sequenze ripetute (Muller et al., 2009). Inizialmente, per il sequenziamento del genoma di pomodoro, è stata adottata la strategia BAC-by-BAC, già impiegata per altri genomi quali *A. thaliana* e riso. Tale strategia prevede innanzitutto il sequenziamento dei BAC ancorati alla mappa genetica e successivamente, mediante la strategia di BAC *walking*, l'estensione della sequenza al fine di individuare l'insieme di frammenti genomici utili a coprire la regione cromosomica di interesse. L'emergere delle "tecnologie di sequenziamento di nuova generazione" come Roche 454, Illumina Solexa, Applied Biosystems SOLiD, ha reso disponibili alternative strategiche e tecnologiche molto valide per il sequenziamento del genoma di pomodoro. Pertanto, il sequenziamento dell'intero genoma è proseguito con un approccio '*whole genome shotgun*' (WGS). La combinazione di tale approccio con i risultati già disponibili ha accelerato notevolmente il termine del progetto di sequenziamento. Parallelamente il gruppo di lavoro iTAG (*international Tomato Annotation*

Group), che vede coinvolte unità di bioinformatica provenienti da Europa, Asia e Stati Uniti, sta producendo un'annotazione omogenea e attendibile del genoma (Mueller et al., 2009).

Ottenute le sequenze, diviene importantissima l'analisi del genoma per la comprensione della biologia dell'organismo; ancora più importante è l'analisi comparata di più genomi attraverso la genomica comparativa, che si basa sul confronto delle sequenze e dell'organizzazione di genomi di organismi appartenenti a specie diverse o alla stessa specie. La genomica comparativa consente di identificare le regioni codificanti, di assegnare loro una funzione e di identificare le regioni non tradotte coinvolte nella regolazione genica. L'analisi comparativa rappresenta certamente l'approccio di bioinformatica più rilevante per la caratterizzazione funzionale delle sequenze nucleotidiche e proteiche. Oggi la genomica comparata ha evidenziato non tanto la diversità dei geni nei diversi organismi quanto la conservazione in intere famiglie geniche.

3.1.4 Obiettivi

Negli ultimi anni il miglioramento genetico molecolare corre di pari passo con gli approcci innovativi di genomica e con gli avanzamenti in campo bioinformatico.

La disponibilità delle sequenze dei genomi di patata e pomodoro e delle mappe genetiche facilita notevolmente lo sviluppo di approcci di *breeding* molecolare, che sono finalizzati a superare le difficoltà imposte dalla lunghezza e dalla laboriosità dei metodi di miglioramento genetico classico, permettendo di aumentare rapidamente la quantità di risorse genetiche a disposizione per le specie selvatiche.

Recentemente, presso i laboratori del DiSSPAPA, sono state ottenute le prime mappe di associazione genetica mediante i marcatori molecolari DArT delle specie selvatiche di patata *S. commersonii* (Iorizzo et al., 2009) e *S. bulbocastanum* (Mann et al., 2011). Le mappe genetiche DArT rappresentano una risorsa importante per la valorizzazione del patrimonio genetico delle specie selvatiche di patata e per studi di genomica strutturale e funzionale volti al mappaggio dei caratteri d'interesse.

L'obiettivo principale di tale ricerca è stato la messa a punto di una strategia di bioinformatica basata sulla genomica comparativa per la validazione delle mappe genetiche DArT disponibili e per la conferma dell'utilità dei marcatori DArT nella selezione assistita negativa o positiva. E' stato possibile allineare i marcatori molecolari DArT alle sequenze genomiche di patata e pomodoro e valutare la loro qualità in termini di copertura nucleotidica, nonché la distribuzione cromosomica su entrambi i genomi. Dall'analisi degli allineamenti è

stato possibile identificare marcatori molecolari DArT specifici delle specie selvatiche e associati a geni di resistenza. Infine, è stato possibile effettuare un'analisi di sintenia tra patata e pomodoro, utile alla validazione della sequenzialità dei marcatori presenti nei gruppi di associazione delle mappe genetiche e all'annotazione funzionale agli stessi.

3.2 Materiali e Metodi

Il set di dati di partenza è rappresentato dai marcatori molecolari DArT costituenti le prime mappe di associazione genetica delle specie selvatiche *Solanum commersonii* e *S. bulbocastanum* prodotte da Iorizzo et al. (2009) (figura 3.1) e da Mann et al. (2011) (figura 3.2). Tali marcatori sono stati sequenziati presso la piattaforma tecnologica GenoPOM (<http://wpage.unina.it/genopom>) del DiSSPAPA, mediante la tecnologia BigDye Terminator con il sequenziatore ABI PRISM 3100 Genomic Analyzer. Dalle sequenze ottenute sono state rimosse le sequenze contaminanti del vettore di clonazione ed eliminate le regioni di scarsa qualità e bassa complessità. Inoltre, è stata effettuata un'analisi della lunghezza dei marcatori DArT e una suddivisione numerica degli stessi per specie di appartenenza.

I 1423 marcatori DArT così selezionati sono stati allineati lungo le sequenze cromosomiche dei genomi di patata *S. phureja* (<http://www.potatogenome.net>) e di pomodoro *S. lycopersicum* (http://solgenomics.net/genomes/Solanum_lycopersicum/genome_data.pl) utilizzando il programma GenomeThreader (Gremme et al., 2005) e filtrando i risultati con un *coverage* (percentuale dei nucleotidi della sequenza DArT allineata sulla lunghezza totale del marcatore DArT) e un punteggio di allineamento superiore al 70%.

La qualità e l'attendibilità degli allineamenti è stata verificata valutando prima la specificità e la distribuzione degli stessi sui 12 cromosomi di patata e pomodoro, e successivamente, la copertura nucleotidica totale per ogni cromosoma su entrambi i genomi.

E' stata poi analizzata la tipologia degli allineamenti distinguendoli in tre principali classi di allineamento: "Singleton", "Overlapping" e "Both". I DArT appartenenti alla categoria "Singleton" sono marcatori che allineano in una regione genomica individuata esclusivamente da loro stessi, ovvero allineano "da soli" sul genoma in un'unica regione genomica o in più regioni, individuando le categorie "Singleton one match" e "Singleton many matches" rispettivamente (figura 3.3). Analoga suddivisione, ma leggermente più complessa, è stata effettuata per i marcatori DArT "Overlapping". Questi sono marcatori che allineano in una regione genomica con altri DArT; anche tali marcatori a loro volta individuano due ulteriori categorie: "Overlapping one region" e "Overlapping more region". Nel primo caso si identificano i marcatori DArT che allineano sempre con lo stesso raggruppamento di marcatori; se allineano una volta sola sul genoma identificano la categoria "Overlapping one region one match", se allineano più volte identificano la categoria "Overlapping one region many match"

(figura 3.3). Nella classe “Overlapping more region”, invece, rientrano i marcatori DArT che allineano più volte sul genoma ma sempre con gli stessi marcatori (es. il marcatore 10 allinea più volte sul genoma ma sempre con i marcatori 12, 13, 14) o con diversi raggruppamenti di marcatori (es. il marcatore 15 allinea più volte con i marcatori 16, 17, 18 ma allinea anche in un’altra regione genomica con i marcatori 19, 20 e 21) (figura 3.4). La classe “Both” raggruppa i marcatori DArT che ricadono in entrambe le categorie “Singleton” e “Overlapping”.

Successivamente sono stati selezionati i marcatori DArT cromosoma specifici, quelli specifici per la patata e quelli specifici per le specie selvatiche *S. commersonii* e *S. bulbocastanum*. Inoltre, utilizzando le annotazioni disponibili per i genomi di patata e pomodoro, è stata valutata l’associazione dei marcatori a geni o a regioni espresse (EST, TC o geni). Particolare interesse è stato rivolto ai geni di resistenza, mediante l’allineamento con il software BLAST di tutti i marcatori DArT ai geni di resistenza raccolti nella banca dati del “*Plant Resistance Genes Database*” disponibile al link <http://prgdb.cbm.fvg.it>.

Infine, per confermare la validità e l’utilità delle mappe di associazione disponibili, è stata valutata la corrispondenza dei marcatori presenti nei gruppi di associazione genetica delle specie selvatiche *S. bulbocastanum* e *S. commersonii* ai cromosomi di patata e pomodoro, valutandone la posizione e la sequenzialità sui cromosomi. Per ciascun gruppo di associazione è stata poi valutata la coerenza dell’annotazione funzionale tra i due genomi.

Tutte le analisi bioinformatiche sono state condotte presso la piattaforma di genomica e post-genomica “*GenoPOM*” di Portici presso la Facoltà di Agraria, in collaborazione con il gruppo di bioinformatica della prof.ssa Chiusano del DiSSPAPA.

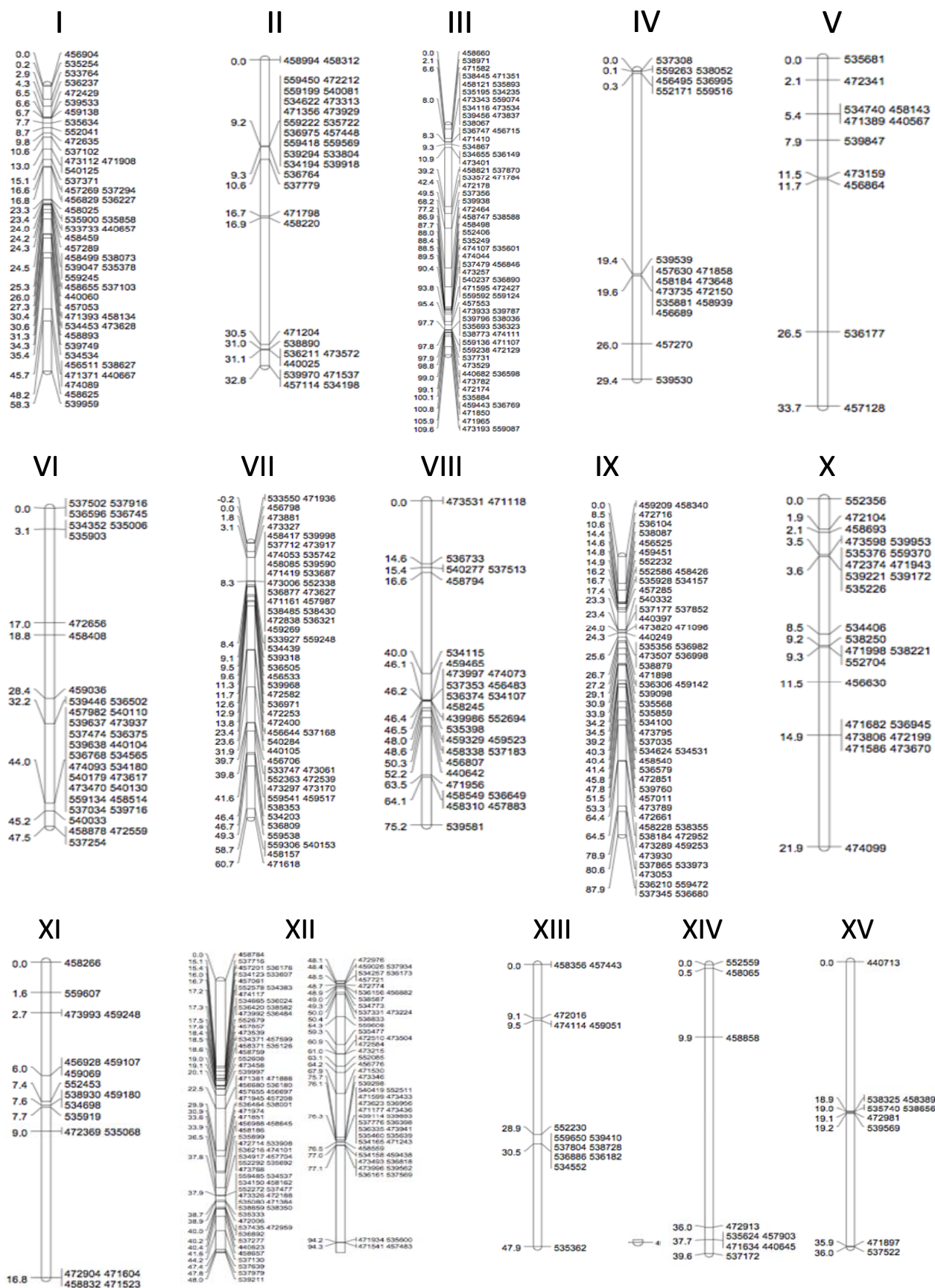


Figura 3.1: Mappa di associazione genetica prodotta per la specie selvatica *S. commersonii* da Iorizzo et al. (2009).

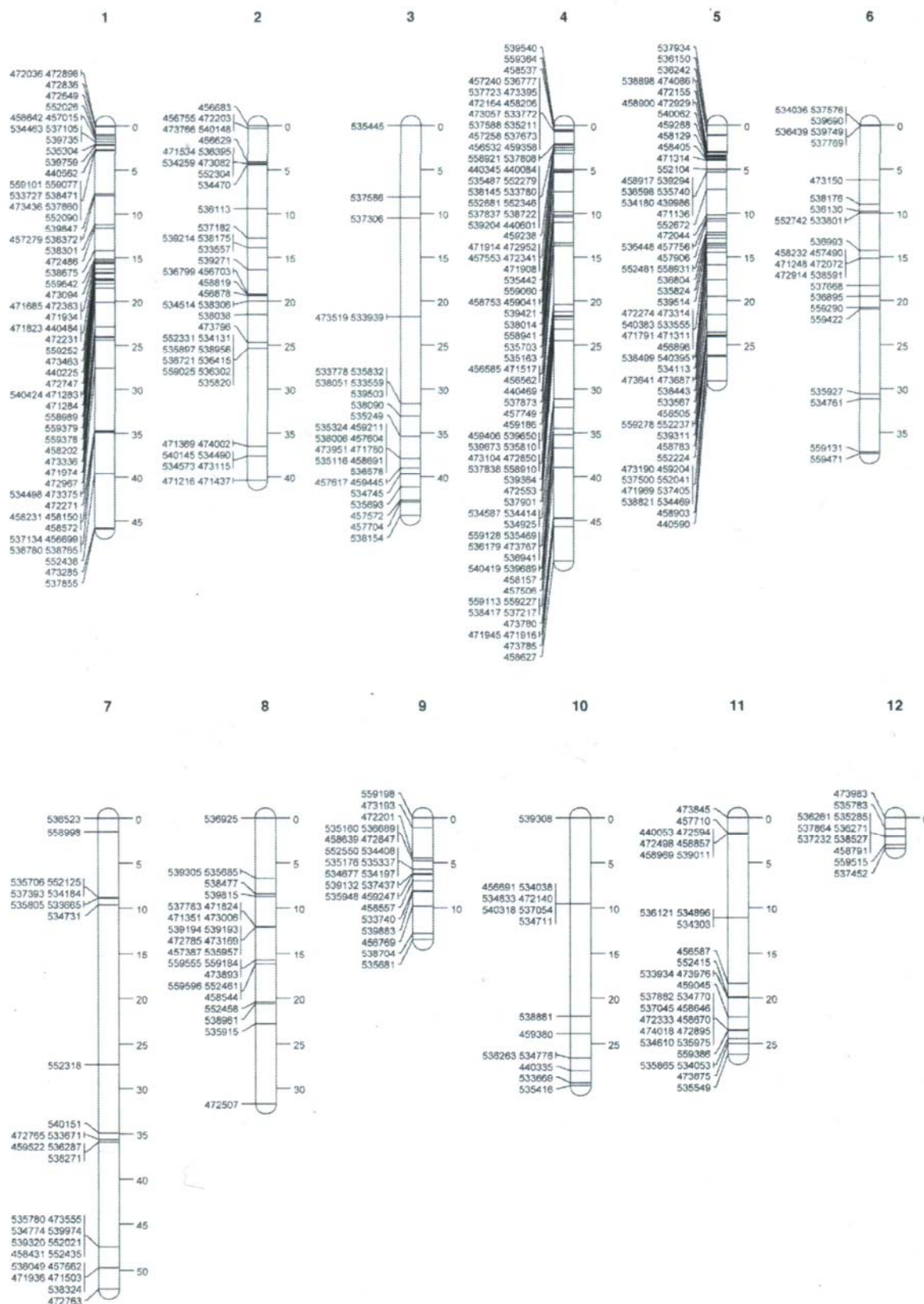


Figura 3.2: Mappa di associazione genetica prodotta per la specie selvatica *S. bulbocastanum* da Mann et al. (2011).

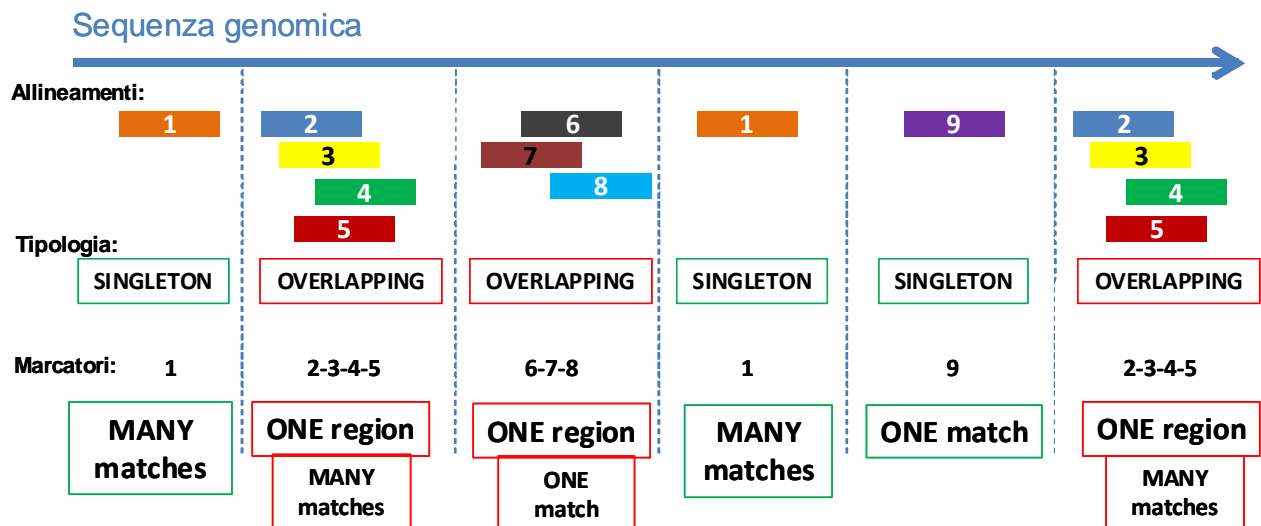


Figura 3.3: Schematizzazione grafica delle varie tipologie di allineamenti riscontrabili. Sono riportate le classi di allineamento “Singleton one match” per il marcatore n. 9 (viola) e “Singleton many matches” per il marcatore n. 1 (arancione); le classi di allineamento “Overlapping one region one match” per i marcatori 6-7-8 e “Overlapping one region many matches” per i marcatori 2-3-4-5. Ulteriori spiegazioni nel testo.

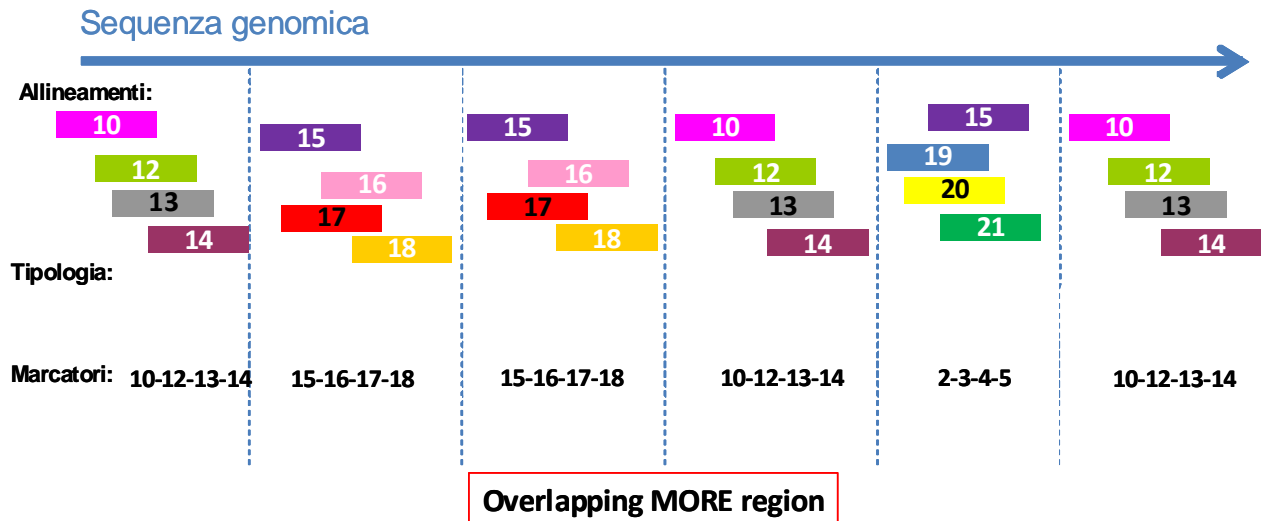


Figura 3.4: Schematizzazione grafica degli allineamenti overlapping more regions. Ulteriori spiegazioni nel testo.

3.3 Risultati

Dall'analisi delle sequenze ottenute per i 1423 marcatori DArT è emerso che la lunghezza media delle sequenze è stata di 538.5 basi, la lunghezza massima di 979 basi e la minima di 34 basi (figura 3.5). L'87% dei marcatori ha mostrato una lunghezza variabile dalle 350 e 800 basi, 3 marcatori (0.2%) hanno mostrato una lunghezza inferiore o uguale a 100 basi e 2 marcatori (0.1%) hanno mostrato una lunghezza compresa tra 950 e 1000 nucleotidi (figura 3.5).

In base ai risultati dell'array, i marcatori DArT sequenziati sono stati distinti in seguenti classi di appartenenza. Cinquecentocinquanta sono risultati appartenenti alla specie selvatica *S. commersonii*, 770 a *S. bulbocastanum* e 103 comuni tra le due specie (tabella 3.1). Tutti i marcatori DArT disponibili sono stati allineati alle sequenze cromosomiche dei genomi di patata *S. phureja* e di pomodoro *S. lycopersicum*. Il 70% dei marcatori è stato mappato sul genoma di patata e il 79% su quello di pomodoro (tabella 3.1).

Dall'analisi dei risultati ottenuti dagli allineamenti dei marcatori DArT sui genomi di patata e pomodoro è emerso che, nonostante sia stato imposto un filtro del 70% di punteggio e copertura nucleotidica (*coverage*), la maggioranza degli allineamenti ha mostrato percentuali superiori al 90% di *coverage* sia in patata (figura 3.6 pannello A, riquadro rosso) che in pomodoro (figura 3.6 pannello B, riquadro rosso). Ciò ha evidenziato che la qualità degli allineamenti è molto buona; infatti, la maggioranza dei marcatori ha allineato per la totalità della loro lunghezza e la distribuzione dei punteggi è stata uniforme.

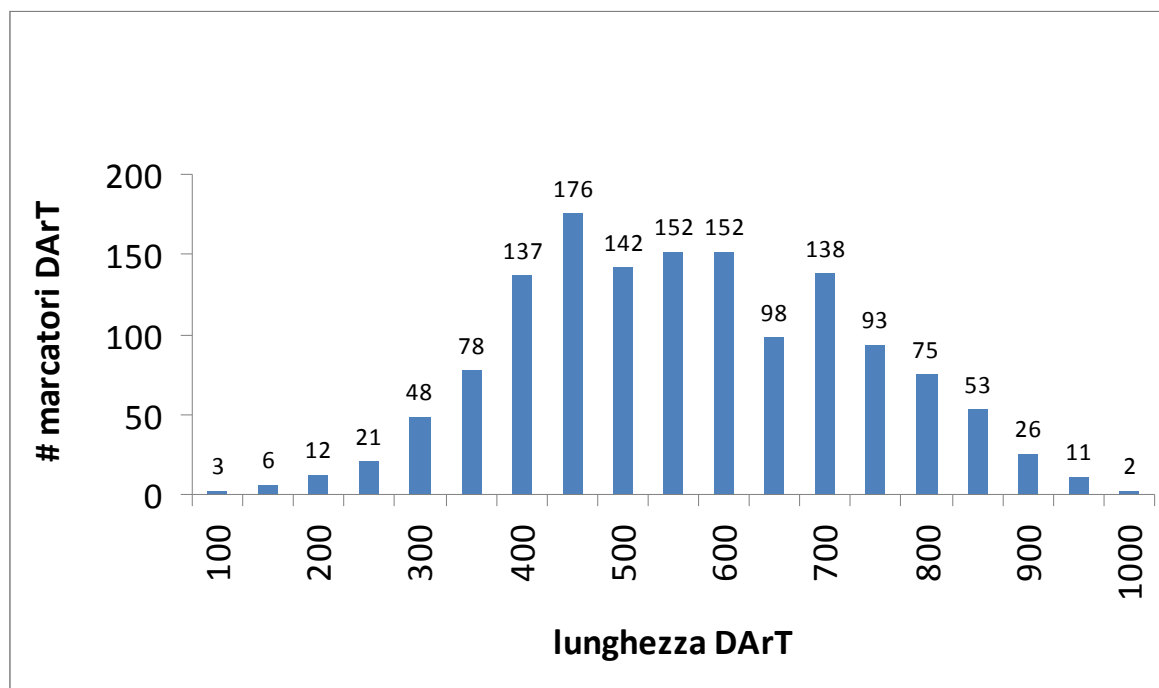
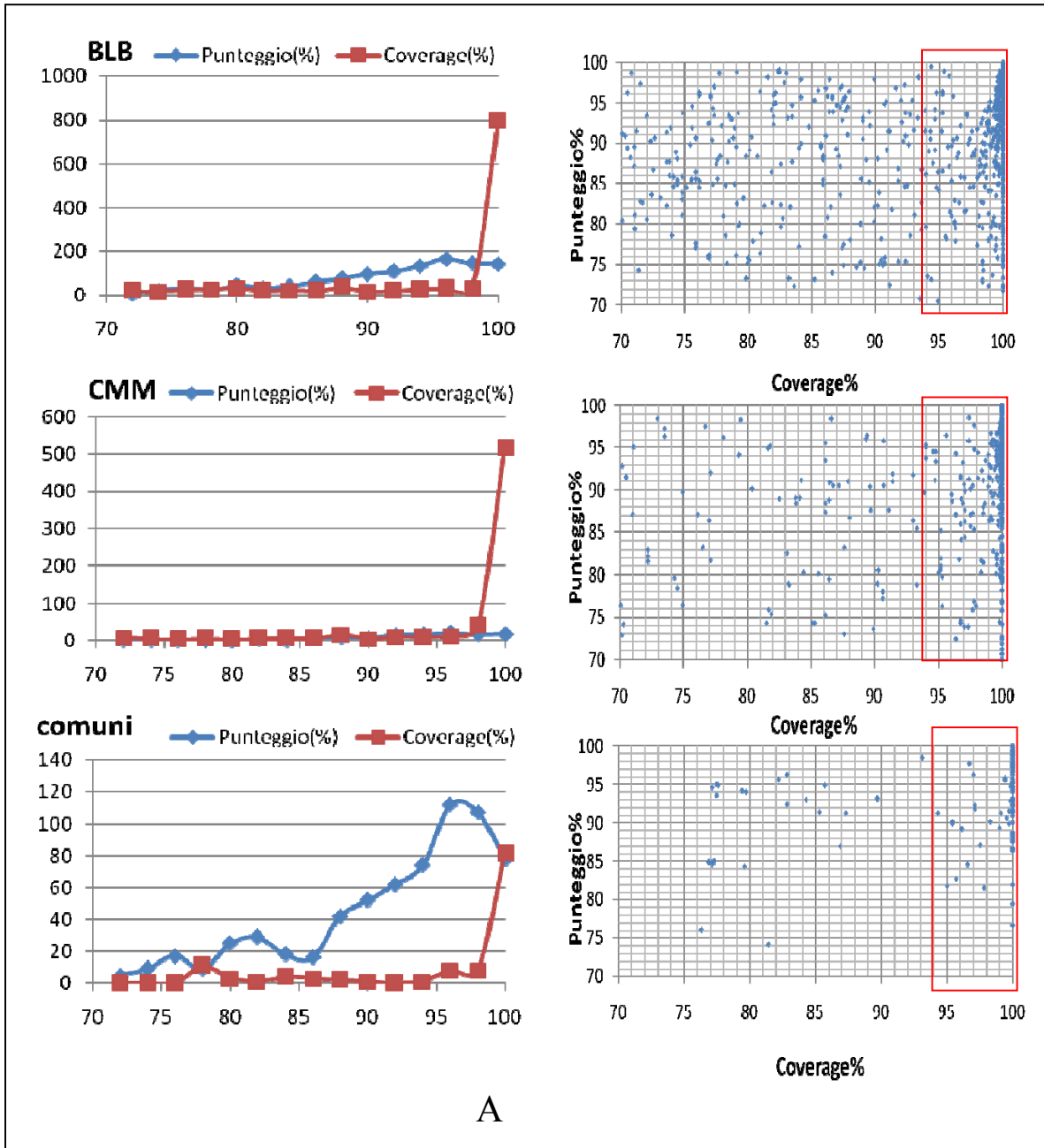


Figura 3.5: Analisi della lunghezza dei 1423 marcatori DArT sequenziati.

Tabella 3.1 Distribuzione degli allineamenti dei marcatori DArT sui genomi di patata e pomodoro. I marcatori sono stati suddivisi in DArT appartenenti a *S. bulbocastanum* o *S. commersonii* e ai DArT *comuni* alle due specie.

DArT	PATATA			POMODORO	
	TOT # allineati (%)	# non allineati (%)	# non allineati (%)	# allineati (%)	# non allineati (%)
<i>S. bulbocastanum</i>	770	544 (71)	226 (29)	594 (77)	176 (23)
<i>S. commersonii</i>	550	338 (65)	212 (39)	447 (81)	103 (19)
<i>comuni</i>	103	73 (71)	30 (29)	83 (81)	20 (19)
TOTALI	1423	1005 (71)	468(33)	1124 (79)	299 (21)



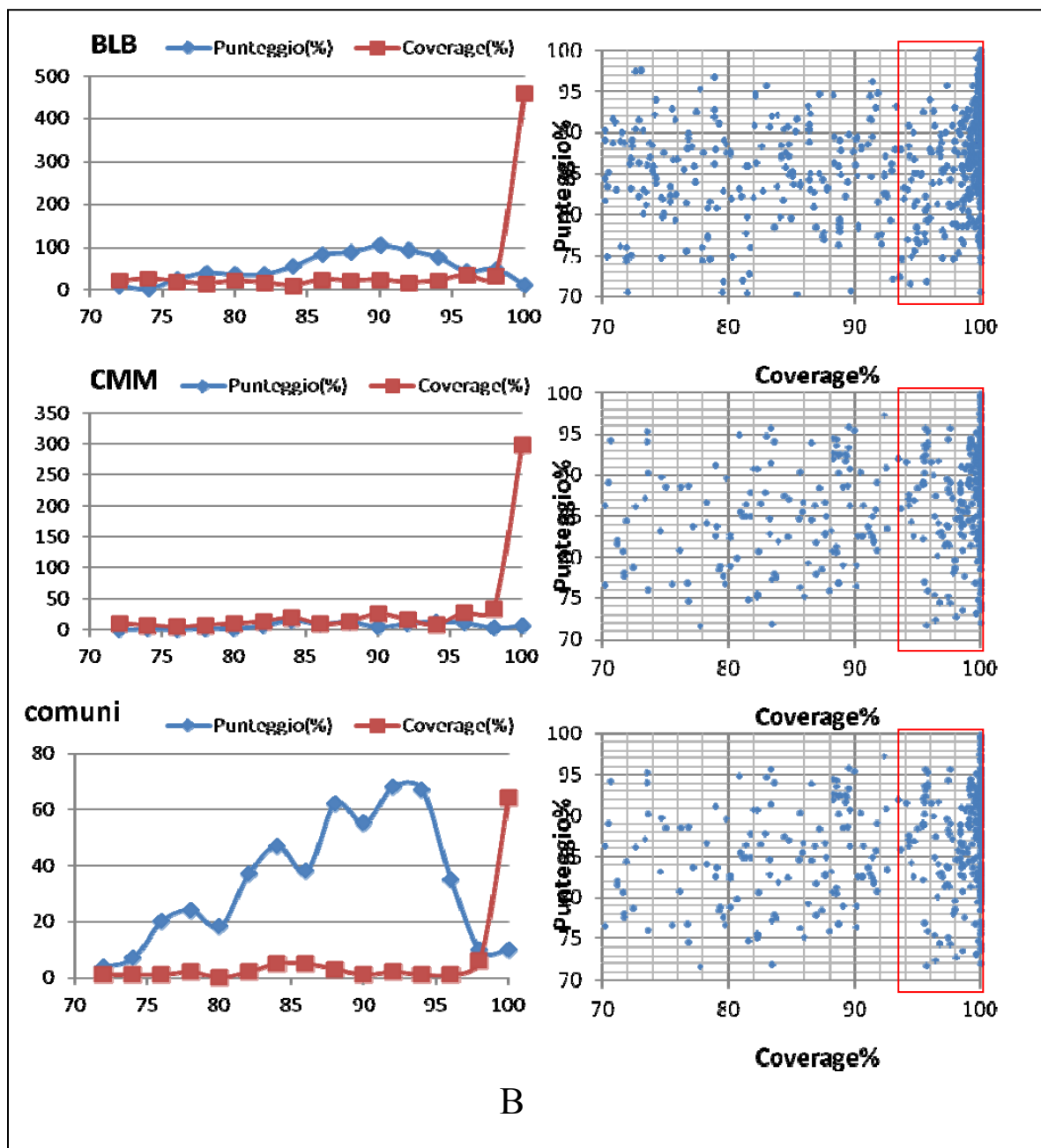
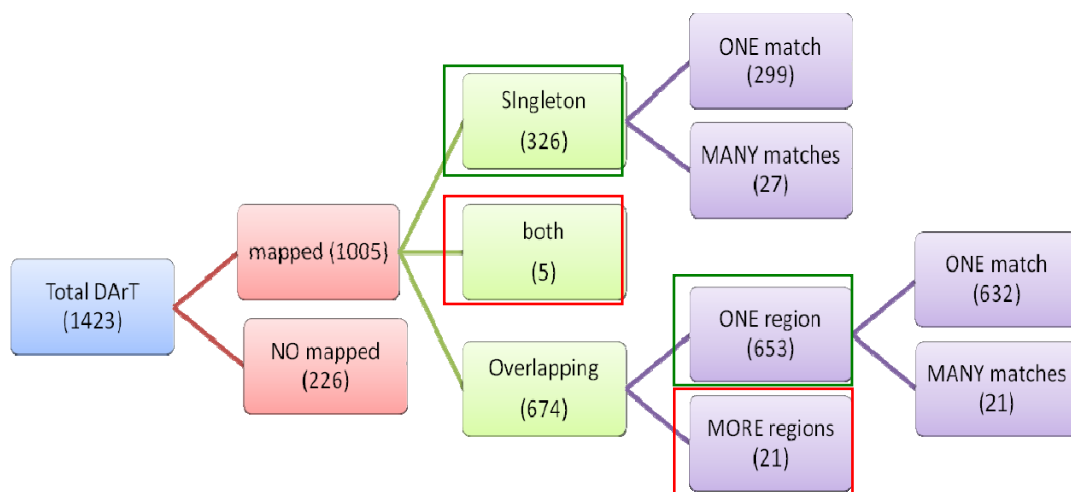


Figura 3.6: Risultato dell'analisi di allineamento dei marcatori DArT verso i genomi di patata (A) e pomodoro (B) mediante il programma GenomeThreader. BLB indica i marcatori DArT di *S. bulbocastanum* e CMM indica i marcatori DArT di *S. commersonii*. Coverage indica la copertura nucleotidica percentuale dei marcatori. In ciascun pannello A e B, per ciascuna classe di marcatori (CMM, BLB, comuni), sono presenti due grafici. Nel grafico di sinistra sull'asse delle ordinate è riportato il numero degli allineamenti in funzione del punteggio % (azzurro) e del coverage % (rosso). Nel grafico di destra ogni punto azzurro rappresenta un allineamento, sull'asse delle ascisse è riportato il punteggio %, sull'asse delle ordinate il coverage %, nel riquadro rosso sono messi in evidenza gli allineamenti che hanno riportato valori di coverage e punteggio maggiori.

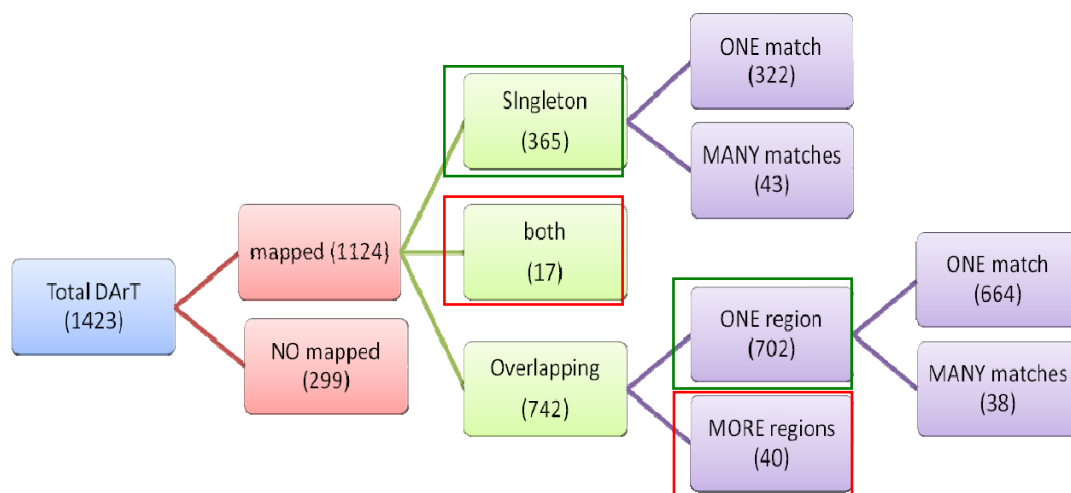
E' emerso, inoltre, che i DArT sono marcatori specifici in quanto cadono in regioni non ridondanti del genoma. Tra i marcatori DArT allineati, infatti, il 93% (931) allinea una sola volta sul genoma di patata e solo il 7% (74) allinea più volte. Analogo risultato si è ottenuto in pomodoro in cui l'88% (986) dei DArT allinea una sola volta e solo il 12% (138) allinea più volte. Inoltre, per entrambi i genomi qualora i marcatori DArT allineino più volte, la maggioranza degli allineamenti multipli cade su altri cromosomi anziché nello stesso cromosoma (dati non mostrati).

Così come riportato nei materiali e metodi, i marcatori DArT allineati sono stati catalogati in tre principali classi di allineamento: "Singleton", "Overlapping" e "Both". Il 97% dei DArT allineati su patata e il 94% di quelli allineati su pomodoro ricade nella classe "Singleton" e nella sottoclasse "Overlapping one region" (figura 3.7 riquadri con bordo verde scuro). Queste due categorie, oltre ad essere le più rappresentate, sono anche le più interessanti in quanto identificano regioni specifiche nel genoma. La classe "Both" e la sottoclasse "Overlapping more region", invece, sono risultate le più problematiche da seguire perché implicano la visione contemporanea di diversi tipi di allineamenti, identificando diverse regioni sul genoma. Tuttavia esse rappresentano solo il 2.5% degli allineamenti in patata e il 5% in pomodoro (figura 3.7 riquadri con bordo rosso).

Sia in patata (figura 3.8) che in pomodoro (figura 3.9) la distribuzione quantitativa in classi di allineamento per i marcatori appartenenti alle singole specie (*S. commersoni*, *S. bulbocastanum* e comuni) è stata analoga a quella riportata precedentemente per i marcatori totali, sia per le due classi più specifiche "Singleton" e "Overlapping one region" (che sono le più abbondanti) che per quelle "Both" e "Overlapping more region". Anche in questo caso queste ultime due classi sono state quelle meno rappresentate (figura 3.8 e figura 3.9).



A



B

Figura 3.7: Diagramma che mostra la suddivisione dei marcatori DArT in classi di allineamento mettendo a confronto il genoma di patata (A) e di pomodoro (B). I riquadri con i bordi verde scuro indicano le classi di allineamento più abbondanti e specifiche, i riquadri con i bordi rossi indicano le classi di allineamento meno abbondanti e specifiche.

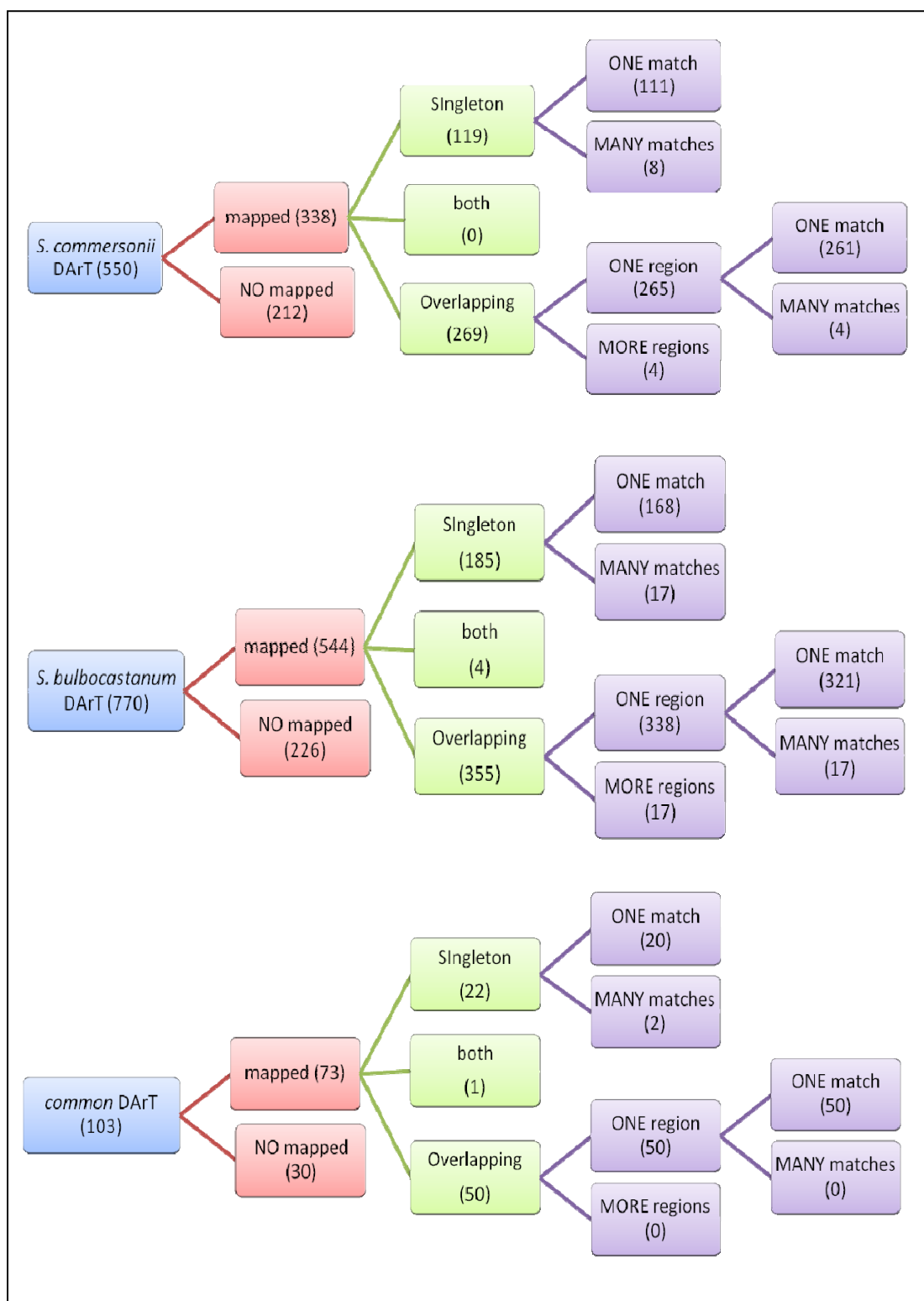


Figura 3.8: Diagramma che mostra la suddivisione dei marcatori DArT in classi di allineamento per singola specie nell'ambito del genoma di patata. Common indica i DArT comuni.

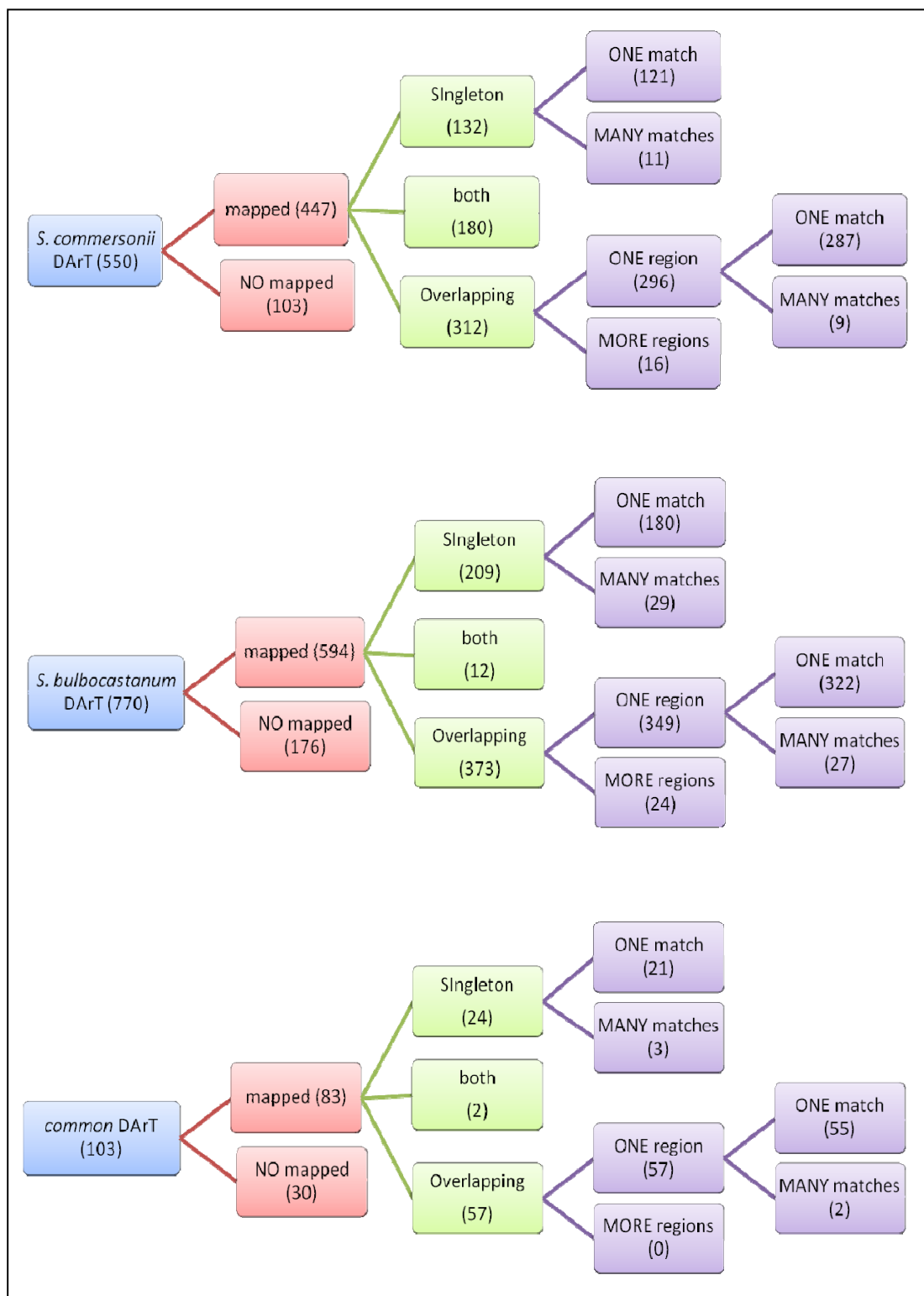


Figura 3.9: Diagramma che mostra la suddivisione dei marcatori DArT in classi di allineamento per singola specie nell'ambito del genoma di pomodoro. Common indica i DArT comuni.

La distribuzione cromosomica degli allineamenti DArT ha mostrato un andamento correlato tra i due genomi. Sia in patata che in pomodoro, infatti, si nota che i marcatori DArT sono distribuiti maggiormente sui cromosomi 1-2-3-4 e 6 (figura 3.10). Se si osserva la distribuzione cromosomica degli allineamenti per le singole specie di appartenenza (*S. commersonii*, *S. blubocastanum* e comuni), è possibile notare che per i marcatori appartenenti alle specie *S. blubocastanum* e *S. commersonii* si conserva lo stesso andamento sopra descritto. Infatti, i marcatori DArT sono distribuiti maggiormente sui cromosomi 1-2-3-4 e 6 sia in patata (figura 3.11) che in pomodoro (figura 3.12). L'unica eccezione è il cromosoma 4 di *S. commersonii*. Per i marcatori comuni, invece, gli allineamenti si distribuiscono maggiormente sui cromosomi 3 e 4 sia per patata che per pomodoro (figura 3.11 e figura 3.12).

Per entrambi i genomi, e nell'ambito delle specie prese in considerazione, i marcatori che allineano una sola volta sono sempre maggiori di quelli che allineano più volte (figura 3.10, figura 3.11, figura 3.12). In particolare, nell'ambito degli allineamenti totali (figura 3.10) per il genoma di patata, l'83% degli allineamenti è di tipo singolo e il 18% è di tipo multiplo; per il genoma di pomodoro il 76% degli allineamenti è di tipo singolo e il 25% è di tipo multiplo, andamento percentuale che si conserva anche nell'ambito degli allineamenti delle singole specie.

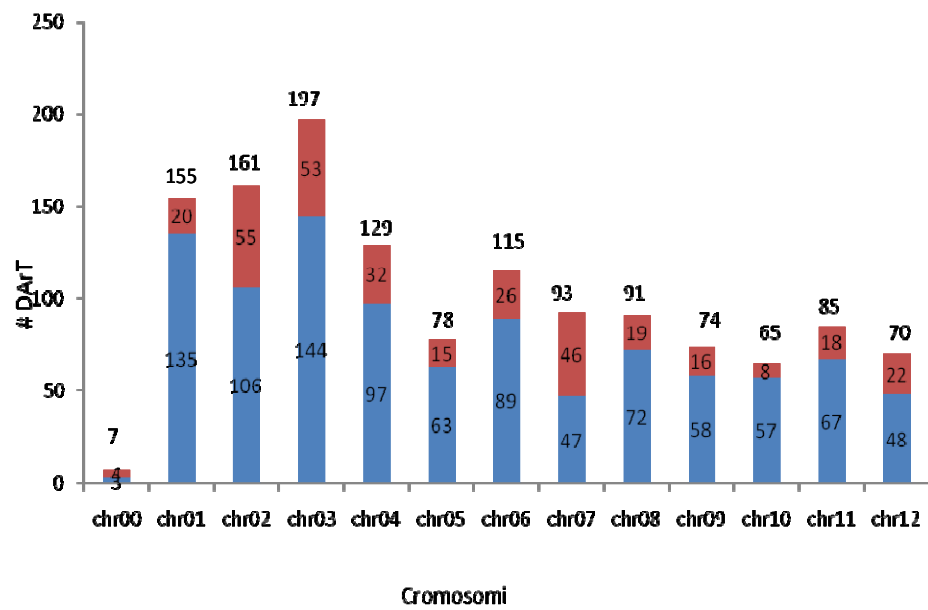
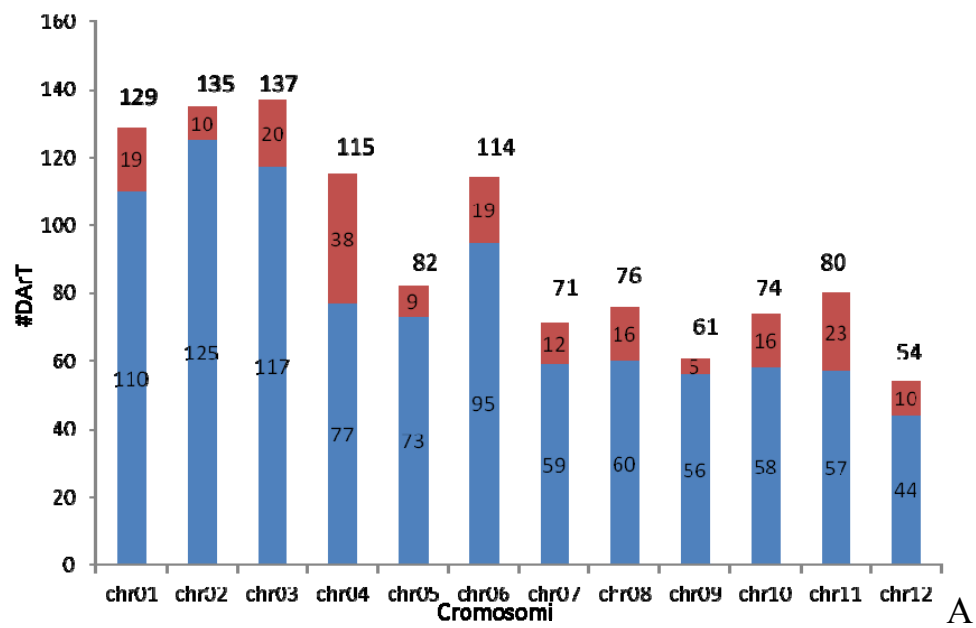


Figura 3.10: Distribuzione cromosomica dei marcatori DArT su genoma di patata (A) e pomodoro (B). Le barre blu indicano gli allineamenti singoli, le rosse indicano i multipli.

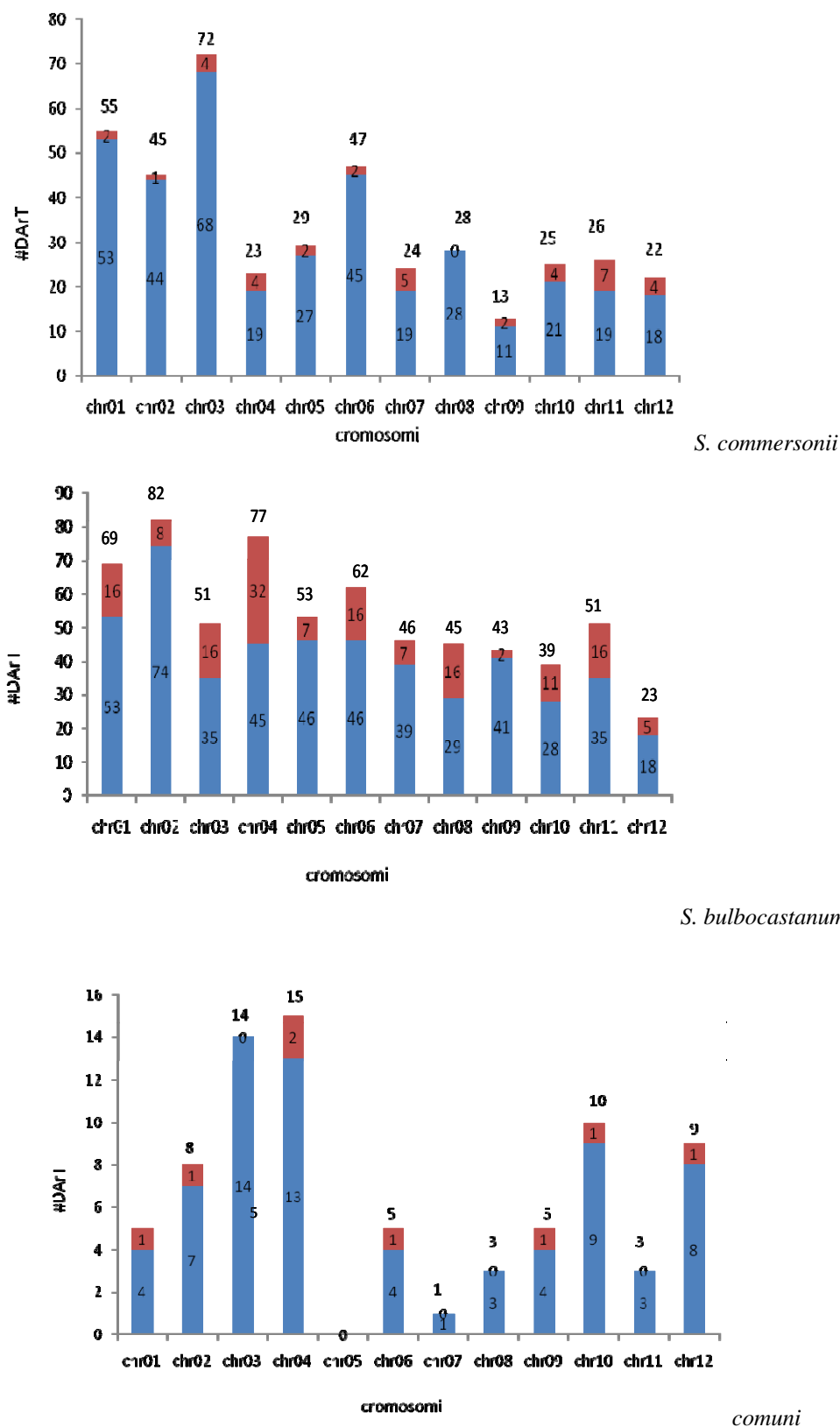
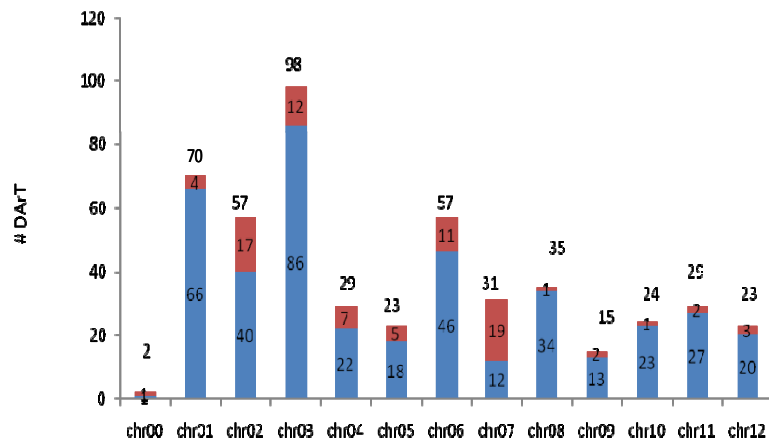
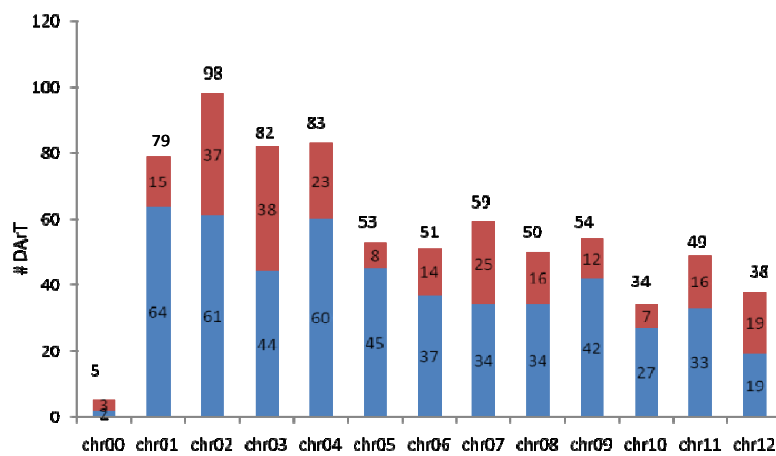


Figura 3.11: Distribuzione cromosomica dei marcatori DArT per singola specie su genoma di patata. Le barre blu indicano gli allineamenti singoli, le rosse indicano i multipli.



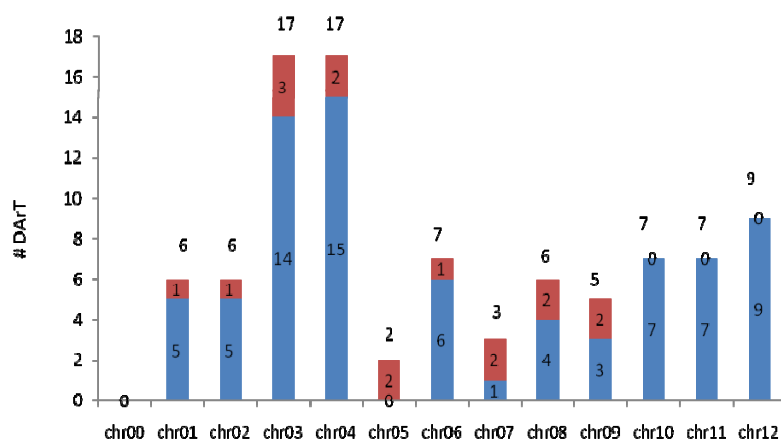
Cromosomi

S. commersonii



Cromosomi

S. bulbocastanum

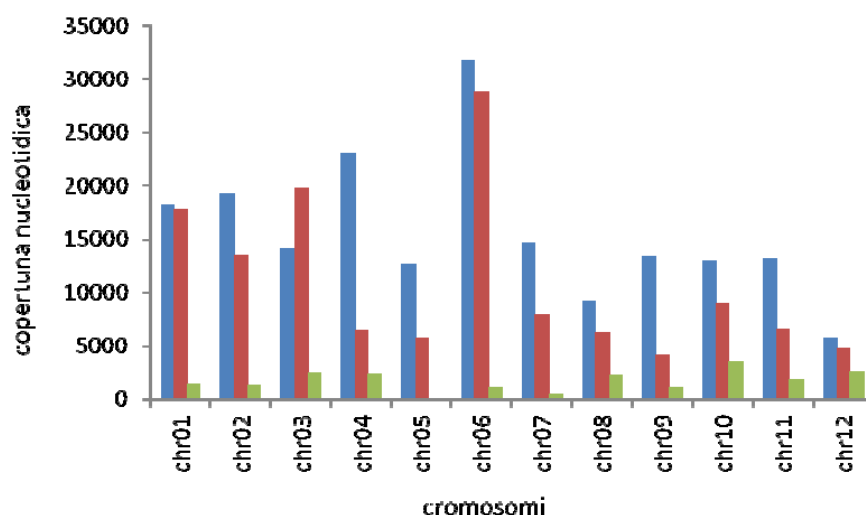


Cromosomi

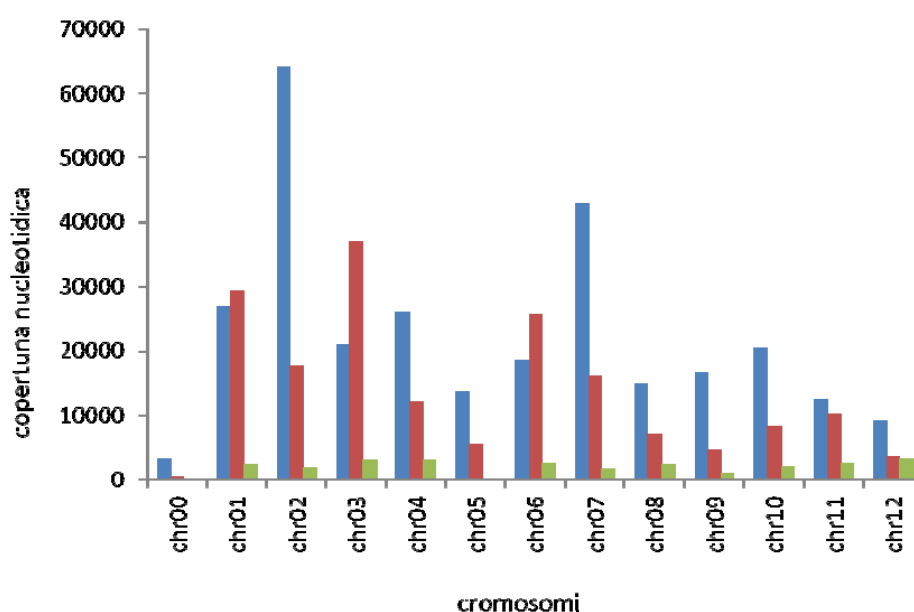
S. communi

Figura 3.12: Distribuzione cromosomica dei marcatori DArT per singola specie su genoma di pomodoro. Le barre blu indicano gli allineamenti singoli, le rosse indicano i multipli.

La figura 3.13 riporta la copertura nucleotidica totale dei marcatori di *S. commersonii*, *S. blubocastanum* e comuni alle due specie, per ogni cromosoma del genoma di patata e di pomodoro. Rispetto alla distribuzione cromosomica dei marcatori DArT, che fornisce il numero dei marcatori allineati per cromosoma, la copertura nucleotidica totale definisce quanti nucleotidi sono coperti dai marcatori per cromosoma, eliminando eventuali allineamenti parzialmente sovrapposti di più DArT nella stessa regione e consentendo una maggiore comprensione della distribuzione dei dati. In patata (figura 3.13 A) è stata osservata una copertura nucleotidica più uniformemente distribuita rispetto a quella di pomodoro (figura 3.13 B), risultata più fluttuante. I cinque cromosomi più rappresentati negli allineamenti (cromosomi 1-2-3-4-6) sono anche tra i più coperti su entrambi i genomi (figura 3.13). In pomodoro, tra i più coperti in termini di nucleotidi, c'è stato anche il cromosoma 7. Dall'analisi dei dati è emerso che sia per il genoma di patata che per quello di pomodoro i marcatori DArT di *S. bulbocastanum* coprono un numero maggiore di nucleotidi. Fanno eccezione il cromosoma 3, che in entrambi i genomi è maggiormente coperto dai DArT di *S. commersonii*, e i cromosomi 1 e 6 di pomodoro, anch'essi maggiormente coperti dai DArT di quest'ultima specie. Per il cromosoma 5 di entrambe le specie non essendoci un numero rilevante di marcatori DArT comuni allineati, non vi è alcuna copertura nucleotidica significativa da parte degli stessi (figura 3.13).



A



B

Figura 3.13: Copertura nucleotidica dei marcatori DArT sui genomi di patata (A) e pomodoro (B). Le barre blu indicano la copertura nucleotidica della specie *S. bulbocastanum*, le barre rosse indicano la copertura nucleotidica della specie *S. commersonii*, e le barre verdi indicano la copertura nucleotidica dei DArT comuni.

Analizzando nel dettaglio gli allineamenti è emerso che il 10.5% di marcatori non allinea né sul genoma di patata né su quello di pomodoro, nemmeno a seguito di allineamenti con il software BLAST. Tali marcatori potrebbero essere interessanti perché specifici delle specie selvatiche. Di questi marcatori, 55 sono risultati specifici della specie selvatica *S. commersonii* e 85 della specie selvatica *S. bulbocastanum*; 10 sono stati comuni alle due specie.

Dato il forte interesse all'identificazione di geni di resistenza da utilizzare per il miglioramento genetico della patata e in attesa dell'annotazione funzionale definitiva dei genomi di patata e pomodoro, le sequenze dei marcatori DArT sono state allineate con i geni di resistenza presenti presso la banca dati del “*Plant Resistance Genes Database*”. Ciò ha avuto lo

scopo di individuare la presenza dei marcatori DArT all'interno dei geni di resistenza e quindi di poter utilizzare tali marcatori come strumenti genomici per la selezione assistita. Tale allineamento ha portato all'identificazione di 23 marcatori DArT associati a geni di resistenza di cui 10 appartenenti a *S. commersonii*, 12 appartenenti a *S. bulbocastanum* e un marcatore comune alle due specie (tabella 3.2). In tutti i casi è stato osservato che l'allineamento dei marcatori DArT cade all'interno dei domini funzionali di geni di resistenza, anche piuttosto importanti come: *Mil* di resistenza a nematodi, *Rp-blb* di resistenza alla peronospora, cluster *Cf-4* e *Cf-9* di resistenza a *Cladosporium fulvum*. Esso cade anche all'interno di molti recettori LRR (leucin rich repeat) SER/THR chinasi noti come domini funzionali di proteine coinvolte nella resistenza (tabella 3.2). Tale dato è stato confermato dall'allineamento dei 23 marcatori con le banche dati disponibili presso i siti sol genomics network (<http://solgenomics.net/>), SolEST (<http://biosrv.cab.unina.it/solestdb/index.php>), TIGR Plant Transcript Assemblies (<http://plantta.jcvi.org/>), Potato Genome Sequencing Consortium (http://www.potatogenome.net/index.php/Main_Page) e Transfac (<http://www.gene-regulation.com/pub/databases.html>), che raccolgono sequenze espresse e trascritte in patata.

Tabella 3.2: Marcatori DArT allineati ai geni di resistenza. E' riportata la specie di appartenenza del marcatore DArT, l'identificativo numerico (ID), il gene di resistenza all'interno del quale il marcatore ha allineato.

Specie	DArT ID	Geni di resistenza associati
<i>S. commersonii</i>	(459516,538442,471204,472261,473061) 471169, 552256 533924 458654 538144	<i>Mil</i> di resistenza a nematodi e <i>Rpi-blb</i> di resistenza a peronospora Cinnamil alcool deidrogenasi (CAD) e fenilacetaldide riduttasi (PAR) Classe LRR (leucin rich repeat) Classe LRR SER/THR Classe SER/THR con i geni <i>prk1</i> e <i>prk4</i> (putative receptor-like serine-threonine protein kinase)
<i>S. bulbocastanum</i>	(538025,533801,536130) (552195,536096,533980) 534113, 540395 538381 458358 536150 539220	Dominio LRR-SER/THR Classe SER/THR Dominio ATP-binding classe SER/THR chinasi Cluster genico <i>Cf-4</i> e <i>Cf-9</i> di resistenza a <i>Cladosporium fulvum</i> classe RLP e classe LRR-SER/THR Fattore di trascrizione WRKY19 classe LRR-NBS-SER/THR Putativo cinnamoyl-CoA reductase-like protein Elemento retrotrasposonico polinucleotidil-transferasi NPR1
<i>comuni</i>	552437	Cinnamil alcool deidrogenasi (CAD) e fenilacetaldide riduttasi (PAR)

L'ultimo tipo di analisi, ha previsto la validazione delle mappe di associazione DArT disponibili. Per quella di *S. bulbocastanum* è stato possibile confermare la corrispondenza, per ognuno dei dodici gruppi di associazione, ai cromosomi di patata e pomodoro. In figura 3.14 è riportato un esempio, relativo al gruppo di associazione 2, della conservazione della successione dei marcatori nei gruppi di associazione presenti nella mappa genetica di *S. bulbocastanum* rispetto ai genomi di patata e pomodoro. Inoltre, per ciascun gruppo di associazione, è stata trovata coerenza dell'annotazione funzionale tra i due genomi (figura 3.14). In alcuni gruppi di associazione sono evidenti processi di inversione della posizione dell'intero gruppo di associazione DArT nella mappa genetica rispetto alla posizione sul genoma di patata o di pomodoro (figura 3.15).

Per la specie selvatica *S. commersonii* non è stato possibile confermare la sequenzialità dei DArT nei gruppi di associazione rispetto alla posizione identificata sul genoma di patata e pomodoro. Ciò è dovuto probabilmente a una mappa di associazione non del tutto perfetta o a causa della parziale incompletezza del genoma pubblicato. Nelle tabella 3.3 e 3.4 vengono riportati esclusivamente i risultati ottenuti sui gruppi di associazione 1 e 2, pur avendo condotto l'analisi su tutti i gruppi di associazione. E' evidente che ogni marcatore facente parte di un gruppo di associazione allinea con lo stesso cromosoma per patata e pomodoro; i marcatori di uno stesso gruppo di associazione, tuttavia, allineano su più cromosomi (tabella 3.3). Tutto ciò non ha consentito l'attribuzione della posizione cromosomica dell'intero gruppo di associazione, risultato frammentato in più cromosomi nell'ambito dei genomi analizzati.

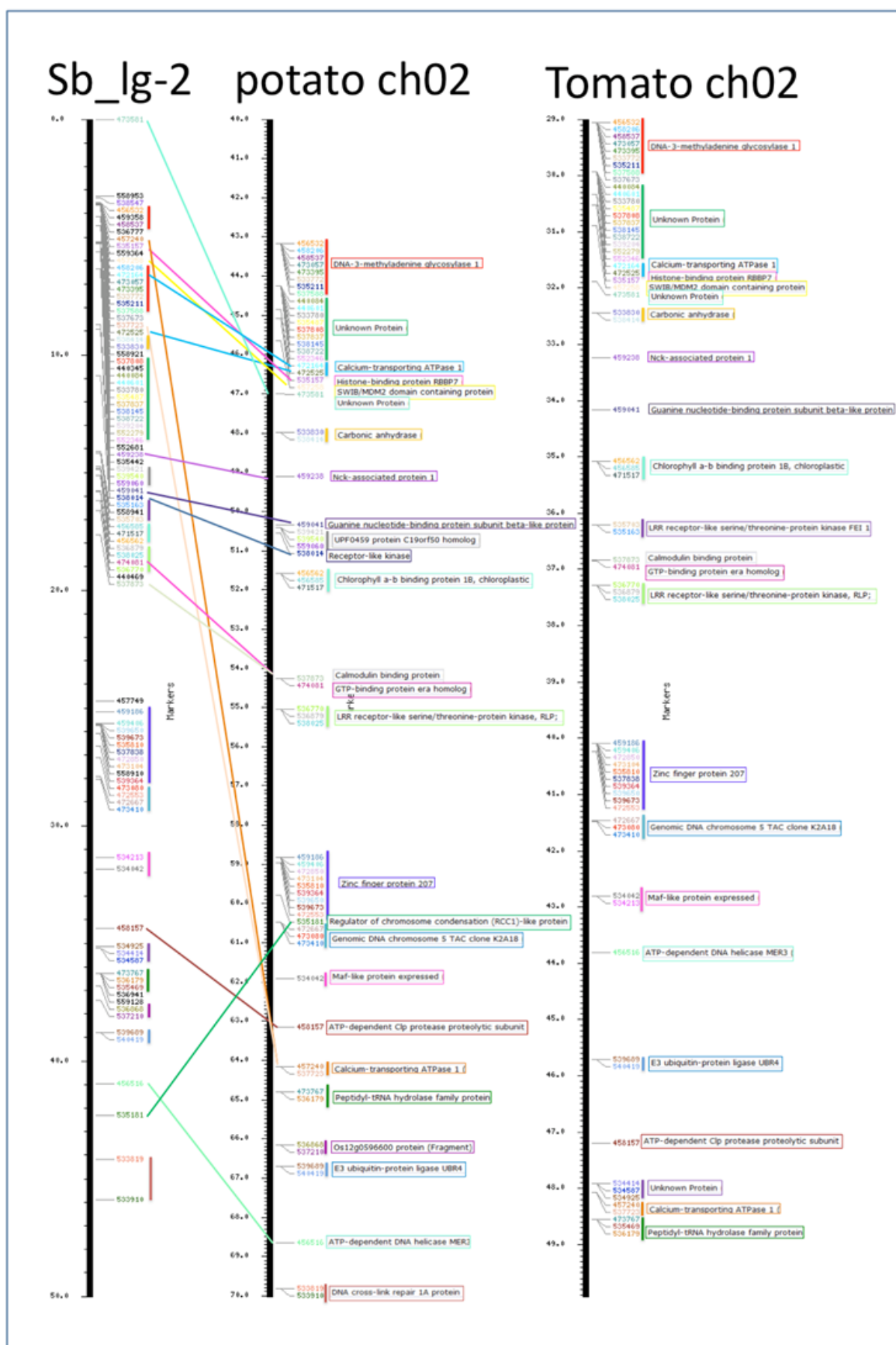


Figura 3.14: Conferma della corrispondenza tra il gruppo di associazione 2 di *S. bulbocastanum* (Sb_Ig-2) al cromosoma 2 di patata (potato ch02) e pomodoro (tomato ch02) e annotazione funzionale.

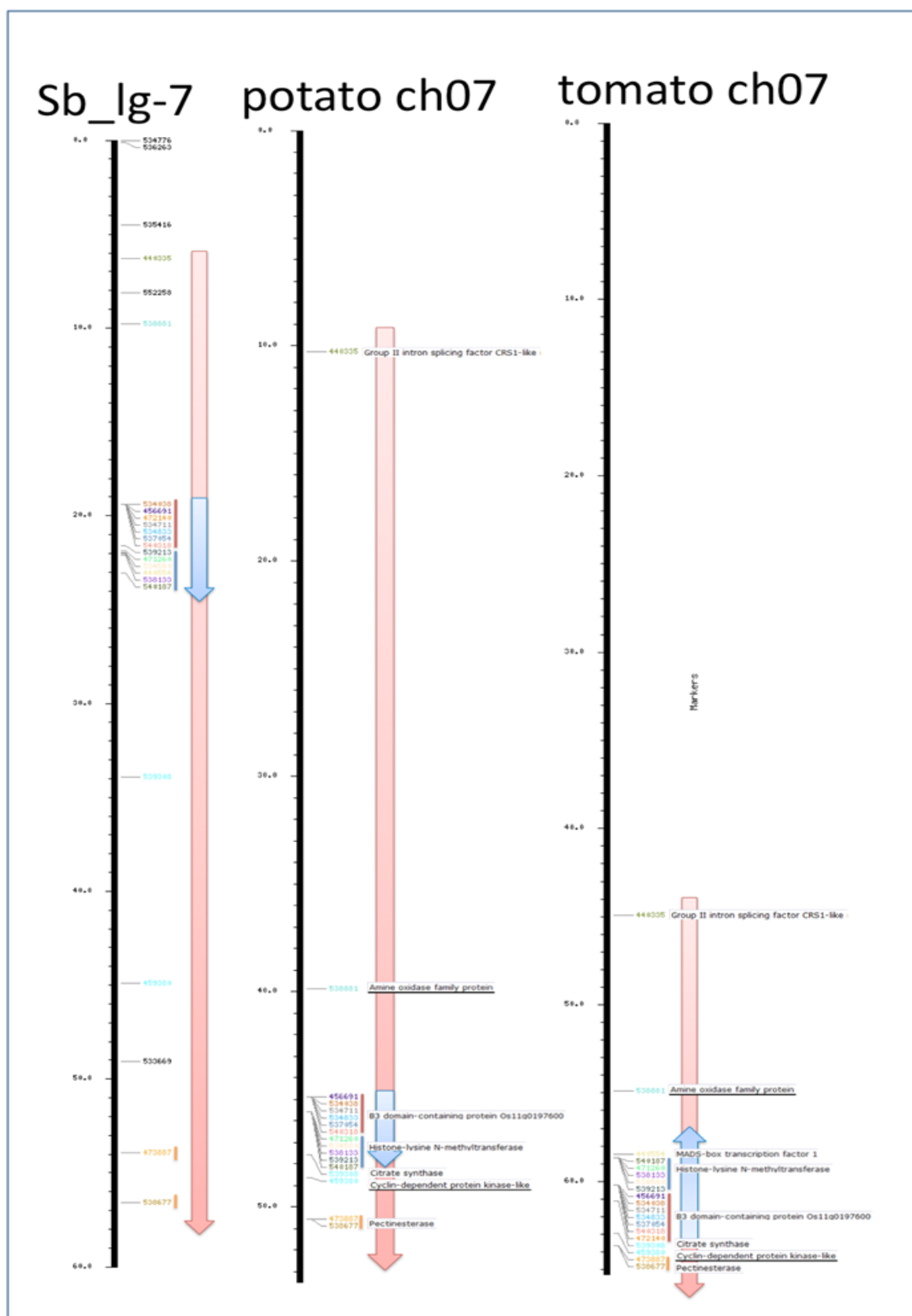


Figura 3.15: Rappresentazione delle inversioni dei gruppi di associazione DArT tra la specie selvatica e il genoma coltivato di patata (potato ch07) e pomodoro (tomato ch07). E' riportato il gruppo di associazione 7 di *S. bulbocastanum* (Sb_lg-7) le frecce azzurre presenti in direzione opposta (dal basso verso l'alto) sul cromosoma di pomodoro, indicano l'inversione nella sequenza dei marcatori.

Tabella 3.3: Risultati relativi all'attribuzione della posizione cromosomica dei marcatori DArT di *S. commersonii* presenti nei gruppi di associazione genetica 1. E' riportato l'identificativo numerico del marcatore DArT (ID), il gruppo di associazione genetica, la distanza dei marcatori nella mappa di associazione genetica, il cromosoma di patata e pomodoro in cui il DArT allinea e la relativa posizione in termini di nucleotidi (start....stop).

DArT ID	Gruppo di associazione	Posizione mappa genetica	PATATA		POMODORO	
			Cromosoma	posizione Start....Stop	Cromosoma	posizione Start....Stop
473336	1	0	4	8690242..8691078	4	5473427..5474270
552104	1	0,326	3	29480627..29481160	3	50309052..50309586
456807	1	1,143	8	312199..312561	8	1894856..1895194
537776	1	1,234	8	37330253..37330605	8	58404702..58405058
536461	1	1,234	9	6696109..6696680	9	3571104..3571672
535740	1	3,239	3	29480627..29481160	3	50309052..50309586
536807	1	3,26	5	3874805..3875236	5	2642446..2642876
538579	1	7,785	8	28523406..28524077	8	52618904..52619563
537035	1	8,312	3	47819005..47819703	3	63571666..63572327
473094	1	8,312	4	50480000..50480330	4	62875936..62876266
540216	1	8,312	12	41389717..41390348	12	54321762..54322393
535575	1	8,312	1	344350..345219	1	72175..72922
440109	1	8,312	6	50977878..50978257	6	41405036..41405415
534400	1	8,312	1	95116459..95116802	1	88619419..88619762
538444	1	8,312	12	41389717..41390348	12	54321762..54322393
535680	1	8,338	3	48840980..48841370	3	62753042..62753442
534427	1	8,338	2	54738890..54739343	2	37070166..37070618
439986	1	8,412	3	29480627..29481160	3	50309052..50309586
537685	1	20,429	4	55945122..55945638	4	58014294..58014748

Tabella 3.4: Risultati relativi all'attribuzione della posizione cromosomica dei marcatori DArT di *S. commersonii* presenti nei gruppi di associazione genetica 2. E' riportato l'identificativo numerico del marcatore DArT (ID), il gruppo di associazione genetica, la distanza dei marcatori nella mappa di associazione genetica, il cromosoma di patata e pomodoro in cui il DArT allinea e la relativa posizione in termini di nucleotidi (start....stop).

DArT ID	Gruppo di associazione	Posizione mappa genetica	PATATA		POMODORO	
			Cromosoma	posizione Start....Stop	Cromosoma	posizione Start....Stop
539812	2	0	6	57090104..57090486	6	45267280..45267589
540340	2	11,938	6	53403621..53404086	6	42736100..42736565
458026	2	13,217	3	19074492..19074992	3	7838916..7839479
537676	2	15,12	1	42969577..42970165	1	41868805..41869392
473454	2	15,12	6	41466075..41466557	6	6834366..36834859
537164	2	15,12	5	3080588..3080965	5	3218682..3219059
537500	2	15,538	3	41053751..41054221	3	58392851..58393410
535530	2	33,416	5	3080588..3080965	5	3218682..3219059
471598	2	33,494	8	312199..312561	8	1894856..1895194
458549	2	33,514	6	7844373..7845065	6	507985..508600
471965	2	33,514	6	50977878..50978257	6	41405036..41405415
472860	2	33,514	2	60476634..60477134	2	41455289..41455786
539798	2	33,514	9	10135739..10136220	9	7140575..7141058
471169	2	33,514	1	4129161..4129776	1	2648224..2649060
538232	2	33,514	12	41389717..41390348	12	54321762..54322393
539377	2	33,514	9	10135739..10136220	9	7140575..7141058
539932	2	33,514	8	25875860..25876210	8	51431371..51431723
459138	2	33,514	1	72022125..72022587	1	71443059..71443420
536576	2	33,539	3	35682466..35682916	3	53932795..53933235
535223	2	35,069	1	344350..345219	1	72175..72922
457704	2	40,553	8	494794..495919	8	2063635..2064733

3.4 Discussione

La patata è la quarta tra le colture alimentari più importanti nel mondo, ma a causa della sua ristretta base genetica necessita di continua attività di miglioramento. Ciò è attuabile mediante il reperimento di geni utili mancanti nella patata coltivata ma presenti nelle specie selvatiche. Esse rappresentano, quindi, un serbatoio di variabilità in cui reperire caratteri per il miglioramento delle moderne varietà coltivate. Molte specie, però, sono sessualmente incompatibili con la patata coltivata e ciò impedisce il trasferimento genico al genepool coltivato attraverso i metodi di miglioramento genetico classico. Per una più adeguata ed efficiente valorizzazione di questo patrimonio genetico è necessario sviluppare strumenti genomici che consentano di potenziare le strategie di miglioramento genetico tradizionalmente utilizzate. Negli ultimi anni, lo sviluppo di risorse genomiche e il supporto di piattaforme bioinformatiche sono diventati strumenti fondamentali per il rapido accesso a geni di interesse (Mochida e Shinozaki, 2010).

In questa ricerca è stata rivolta grossa attenzione alle specie selvatiche di patata *S. commersonii* e *S. bulbocastanum*, che recano numerosi caratteri d'interesse, ma appartenendo al *gene pool* terziario non possono essere incrociate direttamente con la patata coltivata. Le strategie di miglioramento genetico impiegate in queste specie spesso richiedono tempi lunghi; per questo motivo la disponibilità nei confronti delle stesse di strumenti genomici può rendere più facile l'accesso ai geni d'interesse per il miglioramento.

Tra gli strumenti genomici a disposizione particolarmente importanti sono le mappe genetiche di patata. Esse rappresentano uno strumento genomico molto interessante per la comprensione della biologia della patata, rilevando la struttura del genoma e la sintenia con altre *Solanaceae*, come il pomodoro. La grossa utilità di tali mappe sta proprio nel facilitare il miglioramento genetico della patata, attraverso la selezione assistita da marcatori e la trasformazione genetica (Mann et al., 2011).

In questa ricerca, sono stati utilizzati i marcatori molecolari DArT presenti nelle mappe genetiche prodotte per *S. commersonii* (Iorizzo et al., 2009) e *S. bulbocastanum* (Mann et al., 2011). Ad oggi sono numerosi gli studi in cui viene evidenziata l'estrema efficienza dei marcatori molecolari DArT per studi di diversità genetica nell'ambito di collezioni di germoplasma, per la costruzione di mappe genetiche e per la selezione assistita in programmi di *breeding* molecolare (Varshney et al., 2010). I marcatori DArT sono stati ampiamente utilizzati

in numerose specie vegetali. In grano, ad esempio, Neumann et al. (2011) li hanno usati per studi di associazione genica a caratteri agronomicamente interessanti nell'ambito delle specie selvatiche; su avena Oliver et al. (2011) hanno sviluppato mappe genetiche DArT a cui hanno associato i marcatori dei geni della domesticazione. Bolibok-Bragoszewska et al. (2009) hanno usato i marcatori DArT per la creazione di mappe di associazione e per lo studio della similarità genetica nelle varietà e in linee inbred di riso.

Amorim et al. (2009) e Hippolyte et al. (2010) per analisi di variabilità in accessioni di banana, hanno usato 653 e 322 DArT rispettivamente, un numero di marcatori nettamente inferiore a quello utilizzato nella presente attività di ricerca. Ciò consente di ipotizzare che anche i 1423 marcatori DArT usati in questa ricerca possono essere molto utili per valutare la similarità genetica esistente tra le specie selvatiche, ecotipi e varietà.

Vi sono anche esempi di utilizzo dei marcatori DArT per studi filogenetici ed evolutivi in organismi non modello e specie selvatiche di felci e muschi (James et al., 2008). Studi precedenti, inoltre, hanno messo in evidenza l'utilità dei marcatori DArT per associazioni a caratteri quantitativi (QTL). Grewal et al. (2008), attraverso i marcatori DArT, hanno mappato QTL associati alla resistenza a *Pyrenophora teres* in orzo. Inoltre, l'uso combinato dei DArT con marcatori quali *Simple Sequence Repeat* (SSR), *Restriction Enzyme Polymorphism* (AFLP) e *Sequence Tag Site* (STS), diviene di grosso aiuto per generare mappe genetiche ad elevata densità da utilizzare negli schemi di miglioramento genetico molecolare, per creare una rete di informazioni genetiche tra i marcatori e per fare studi di segregazione nelle popolazioni così come riportato in orzo da Wenzl et al. (2006).

Faccioli et al. (2009) sottolineano l'importanza degli strumenti di bioinformatica per identificare loci genetici d'interesse e mettere a punto schemi di *breeding* moderno basati sulla selezione assistita da marcatori molecolari (MAS), mediante l'integrazione di differenti tipi di dati, come quelli genetici, genomici e metabolomici, provenienti da esperimenti non correlati. Anche in questo studio, attraverso un'accurata analisi bioinformatica di allineamento dei marcatori DArT ai genomi di patata e pomodoro e ai geni di resistenza, è stato possibile validare l'utilità di tali marcatori per l'accesso a geni d'interesse presenti nelle specie selvatiche di patata, nonché per studi di sintenia tra i due genomi. Attraverso l'approccio bioinformatico messo a punto in questo studio, infatti, i marcatori molecolari DArT si sono rivelati affidabili, perché presenti nei genomi di patata e pomodoro contro i quali sono stati allineati. Essi sono altresì risultati specifici in quanto hanno allineato per quasi il 100% della loro lunghezza. L'elevata qualità e la specificità degli allineamenti è stata messa in luce anche dal fatto che oltre il 90% dei marcatori ha allineato una sola volta sui genomi analizzati. Inoltre i marcatori DArT hanno

consentito di aumentare le conoscenze nell'ambito delle specie selvatiche analizzate. Tali marcatori possono essere, inoltre, impiegati nella selezione assistita positiva se strettamente associati a geni di interesse o nella selezione assistita negativa, nel caso in cui in programmi di incrocio si voglia ridurre il contenuto di genoma selvatico indesiderato, selezionando sulla base di marcatori molecolari specifici per quel genoma (Barone, 2004).

La presenza dei marcatori in regioni non ridondanti è un fattore molto importante ai fini del miglioramento genetico, per il loro utilizzo nella selezione assistita. La selezione assistita da marcatori molecolari può essere utile, infatti, per la rapida introgressione dei geni desiderati dalle specie selvatiche alle coltivate, velocizzando le procedure di selezione e superando i limiti dei metodi di miglioramento genetico classico. La presenza di un marcatore che sia specifico di una regione e al tempo stesso associato a un gene d'interesse (resistenza o qualità), può dare la possibilità di agire in maniera mirata su quello specifico gene. Infatti, sono numerosi i lavori che presentano le potenzialità dei metodi basati sulla trasformazione e la selezione assistita da marcatori, per l'isolamento e l'inserimento mirato di geni, come quelli di resistenza in varietà coltivate, presentandoli come l'approccio più pratico e promettente per l'ottenimento di cultivar migliorate (Park et al., 2009; Havercort et al., 2008).

I marcatori molecolari DArT, inoltre, sono risultati ben distribuiti su tutti i cromosomi di patata e pomodoro contro i quali sono stati allineati. Per entrambe le specie vi è, però, una maggiore distribuzione degli allineamenti sui cromosomi 1-2-3-4-6 rispetto agli altri. Ciò è indicazione della presenza di maggiori informazioni di sequenza per questi cromosomi. Tale dato è in accordo con quanto osservato da Tinker et al. (2009) su avena, in cui i DArT tendono a essere raggruppati maggiormente in alcune regioni lasciando altre scoperte. Ciò riflette la frequenza dei geni, che è più ricca in alcune regioni rispetto ad altre. Alcuni studi confermano una chiara distribuzione dei marcatori DArT maggiormente in regioni eucromatiche, subtelomeriche o ricche di geni (Wenzl et al., 2006; Oliver et al., 2011). Probabilmente i cromosomi 1-2-3-4-6 di *S. bulbocastanum* e *S. commersonii*, avendo una maggiore distribuzione dei DArT, sono anche più ricchi in geni. Tale dato andrà ulteriormente investigato. Dall'analisi degli allineamenti, inoltre, è emerso che la copertura in termini di nucleotidi dei marcatori DArT di *S. bulbocastanum* su entrambi i genomi è maggiore e più fluttuante rispetto a quella dei marcatori di *S. commersonii*, denotando così, lievi differenze a livello genomico tra le due specie selvatiche di patata, che rispecchiano le già note differenti caratteristiche fenotipiche in termini di resistenze e origine (Jansky et al., 2008).

L'individuazione in questo studio di ben 150 marcatori specifici delle specie selvatiche, ovvero assenti nelle specie coltivate di patata e pomodoro, e di ben 23 marcatori DArT associati

a geni di resistenza sta a sottolineare ancora una volta la loro utilità nella selezione assistita positiva e negativa e nel trasferimento mirato di geni d'interesse.

Dalla nostra analisi è emerso che 5 marcatori DArT di *S. commersonii* sono strettamente associati al gene *Mi* di resistenza a nematodi e contemporaneamente al gene *Rpi-blb* di resistenza a peronospora. Rossi et al. (1998) hanno riportato che il gene *Mi* conferisce resistenza nei confronti di *Meloidogyne incognita* e altri nematodi ed è lo stesso gene che viene indicato come *Meu-1* che conferisce resistenza contro l'afide della patata *Macrosiphum euphorbiae*. Pertanto *Mi* è il primo esempio di gene che conferisce resistenza sia a nematodi che afidi, organismi appartenenti a phyla differenti. Inoltre Rossi et al. (1998) indicano che *Mi* è localizzato in una piccola regione del cromosoma 6 di pomodoro, evidenza in accordo con quanto riscontrato nella presente attività di ricerca in cui i marcatori DArT associati al gene *Mi* sono posizionati sul cromosoma 6 di pomodoro e patata. Uno di questi cinque marcatori DArT, però, allinea con il cromosoma 8 anziché con il 6. Ciò non deve stupire data l'identità di sequenza dell'82% tra il gene *Mi* e *Rpi-blb2*, uno dei due geni di resistenza a *Phytophthora infestans* identificato sul cromosoma 8 di *S. bulbocastanum* (van der Vossen et al., 2005). van der Vossen et al. (2005), infatti, hanno riportato che sul cromosoma 6 sono presenti 15 geni *Mi* omologhi a *Rpi-blb2*. Tale identità di sequenza supporta ulteriormente i risultati ottenuti in questa attività, ovvero che tutti i marcatori DArT che allineano con il gene *Mi* allineano anche con il gene *Rpi-blb*, dimostrando che i marcatori DArT in media coprono (con circa 500 basi) una sequenza in comune ai due geni. L'oomicete *P. infestans* è responsabile di una delle più importanti malattie che affliggono la patata coltivata. Nel 1845-1849, distruggendo gran parte dei raccolti, provocò la più lunga e grave carestia in Irlanda. Nel tempo geni di resistenza sono stati scoperti ed introgressi nella patata coltivata dalla specie selvatica *S. demissum* (Moalcolmson e Black, 1966), ma si è trattato sempre di resistenze razza-specifica che sono state rapidamente superate dal patogeno. Pertanto nuove fonti di resistenza sono state identificate in numerose specie vegetali portando al clonaggio di quattro geni di resistenza a peronospora: *R1* (Ballvora et al., 2002), *R3a* (Huang et al. 2005), *Rpi-blb1* (van der Vossen et al., 2003), e *Rpi-blb2* (van der Vossen et al., 2005). Wang et al. (2008) hanno effettuato uno studio della variazione e della frequenza allelica dei geni *Rpi-blb1* e *Rpi-blb2* tra numerose specie selvatiche di patata. Scopo del lavoro era quello di identificare omologhi di questi geni da usare in programmi di *breeding*. Tra le specie selvatiche usate non era presente la specie *S. commersonii* che, per la prima volta in questo lavoro di tesi, attraverso i 5 marcatori DArT, evidenzia omologie di sequenza con i geni di resistenza a peronospora. Ulteriori studi saranno necessari per validare dal punto di vista biologico questo risultato. E' ipotizzabile il clonaggio e

l'analisi dei locus genici in cui vi è l'allineamento dei marcatori DArT. La presenza in *S. commersonii* di omologie di sequenza con i geni di resistenza a peronospora è supportata anche dal fatto che Jansky et al. (2008) hanno individuato in accessioni di *S. commersonii* fonti di resistenza ad un fungo strettamente correlato alla peronospora.

Nel nostro studio nessuno dei marcatori DArT di *S. bulbocastanum* cade nei geni di resistenza a peronospora noti. Data la complessità di questa famiglia genica, nel clone di *S. bulbocastanum* utilizzato potrebbero esserci varianti alleliche del gene non ancora caratterizzate. Il gene potrebbe anche essere del tutto assente, in accordo con quanto riportato da Lokossou et al. (2010). Un'ulteriore ipotesi potrebbe essere l'assenza di frammenti genomici appartenenti a questo gene nel vetrino DArT. E' ipotizzabile anche l'assenza di marcatori associati a questo gene tra quelli selezionati dalla mappa genetica per essere sequenziati. In *S. bulbocastanum* sono state però identificate altre fonti di resistenza, come quelle nei confronti di *Cladosporium fulvum* (Cf-4 e Cf-9), o numerosi recettori ricchi in residui di leucina (LRR-SER/THR chinasi), noti come domini funzionali di proteine coinvolte nella resistenza (Sanseverino et al., 2009). I marcatori DArT identificati in questa ricerca, quindi, sono utili per l'isolamento dei geni di resistenza nelle specie selvatiche analizzate, il cui studio consentirà l'analisi di varianti alleliche o di omologhi utili in programmi di miglioramento genetico e studi evolutivi dei geni di resistenza. Anche i risultati ottenuti da Singh et al. (2009) suggeriscono che la tecnologia DArT è molto utile nell'identificare geni e in particolare nel valutare la loro associazione a caratteri di resistenza

Il gene *R3a* di resistenza alla peronospora è stato clonato in patata da Huang et al. (2005) attraverso un approccio di genomica comparativa con pomodoro. Anche se i genomi di patata e pomodoro si sono distanziati 7 milioni di anni fa, tra essi vi è un'estesa sintonia nella localizzazione genica. Esiste solo l'8% di differenze genomiche nelle regioni codificanti. L'elevata qualità della sequenza del genoma di pomodoro consente di fare studi di sintonia più accurati di quelli che è possibile effettuare sul genoma di patata. Quindi, sulla base di tale sintonia, le informazioni sulla localizzazione di geni d'interesse presenti nelle specie selvatiche di patata possono essere reperite attraverso studi di genomica comparativa tra i genomi disponibili di patata e pomodoro. Ciò è possibile anche, come è stato fatto in questo studio, dal confronto delle sequenze dei marcatori DArT (corrispondenti a frammenti del genoma di *S. commersonii* e *S. bulbocastanum*) con i genomi di patata e pomodoro.

La mappa genetica DArT di *S. bulbocastanum* è stata usata già da Mann et al. (2011) per confrontare la struttura genomica di questa specie selvatica con quelle ancora non complete del genoma delle specie coltivate di patata e pomodoro e validare i gruppi di associazione

costituenti la mappa. Tale analisi è stata migliorata ed arricchita nella presente attività di ricerca sulla base della disponibilità della sequenza pubblicata nel 2011 del genoma di patata, ottenendo negli allineamenti percentuali di *coverage* superiori al 90% per i genomi analizzati, rispetto al 70% ottenuto da Mann et al. (2011).

In tale studio, grazie alle analisi bioinformatiche e alle sequenze dei genomi di patata e pomodoro, è stata confermata la posizione cromosomica delle mappe di associazione genetica DArT della specie selvatica *S. bulbocastanum* e la conservazione nell'ordine dei marcatori. Per ciascun gruppo di associazione, inoltre, è stata trovata coerenza dell'annotazione funzionale tra i due genomi. Per alcuni gruppi di associazione sono evidenti però processi di inversione della posizione del DArT nella mappa genetica rispetto alla posizione del marcatore sui genomi. Ciò potrebbe essere dovuto a inversioni reali o, in taluni casi, a problemi di assemblaggio in quanto le versioni dei genomi di patata e pomodoro rilasciate non sono del tutto complete. La presenza di tali inversioni è in accordo con i riarrangiamenti strutturali osservati anche nella specie selvatica di banana *Musa acuminata* Borneo rispetto alla cultivar Pisang Lilin, usate entrambe come parentali femminile e maschile rispettivamente delle mappe genetiche DArT prese in esame nello studio di Hippolyte et al. (2010). L'approccio di analisi comparativa delle mappe DArT delle specie selvatiche con i genomi di patata e pomodoro è stato utile per evidenziare le similitudini e le differenze presenti tra le specie selvatiche e quelle coltivate. In questo studio, infatti, alcuni gruppi di associazione presentano i marcatori nella stessa disposizione tra *S. bulbocastanum* e patata, e con posizione invertita tra queste ultime e pomodoro. Ciò sottolinea, come atteso, la stretta relazione genomica esistente tra *S. bulbocastanum* e la patata coltivata rispetto a pomodoro, anche se le stesse appartengono a *gene pool* distanti. Questi risultati sono in accordo con quanto riportato da Mann et al. (2011).

Per quanto concerne la specie selvatica *S. commersonii*, la posizione cromosomica dei marcatori costituenti la mappa genetica di questa specie è risultata la stessa sia su patata che pomodoro, sottolineando la forte sintonia tra i due genomi. A differenza di *S. bulbocastanum*, però, non è stato possibile confermare la sequenzialità dei marcatori costituenti le mappe, in quanto i marcatori di uno stesso gruppo di associazione si sono posizionati su quasi tutti i cromosomi di patata e pomodoro, in modo molto disordinato. Tale dato è in netta discordanza con i precedenti, in cui l'andamento dei risultati di allineamento tra le specie *S. commersonii* e *S. bulbocastanum* è sempre stato piuttosto correlato e confrontabile. Questa evidenza potrebbe dare scarsa affidabilità alla mappa genetica sviluppata da Iorizzo et al. (2009). Sarebbe pertanto interessante disporre delle mappe fisiche FISH, o come già previsto sequenziare il genoma della specie selvatica per allineare i marcatori DArT con la specie dalla quale sono stati ottenuti.

Questo consentirebbe di validare la mappa genetica o di attribuire le differenze riscontrate a una grossa differenza presente tra la sequenza genomica di *S. commersonii* e quella della specie coltivata. Tali differenze tra specie selvatica e coltivata non devono sorprendere in quanto sono note anche numerose differenze genomiche nell'ambito della patata coltivata stessa tra i cloni DH (doppio monoploide) e RH (diploide) usati per generare la sequenza del genoma (Potato Genome Sequencing Consortium, 2011). I due cloni differiscono per il contenuto in amido, in carotenoidi e nell'espressione di alcuni geni.

Ad oggi analisi comparative tra patata e pomodoro sul cromosoma 6 sono state ottenute soprattutto con studi di BAC-FISH. Iovene et al. (2008) hanno dimostrato la colinearità dei BAC tra le due specie nella porzione del braccio lungo del cromosoma 6. Gli autori hanno identificato un'inversione nella regione eucromatica del braccio corto dello stesso cromosoma. Tale inversione non è stata identificata con i precedenti studi di genetica comparativa delle mappe di associazione di patata e pomodoro, che hanno rivelato solo inversioni paracentriche (inversioni che non coinvolgono il centromero) nei cromosomi 5, 9, 10, 11 e 12 (Gebhardt et al., 1991; Tanksley et al., 1992). Tali studi di genetica comparativa tra patata e pomodoro possono fornire informazioni utili sulla evoluzione di due delle più importanti colture nell'ambito delle *Solanaceae*.

Questa ricerca rappresenta il primo studio di genomica comparativa tra le specie selvatiche *S. commersonii* e *S. bulbocastanum* e le specie coltivate di patata e pomodoro attraverso il confronto computazionale dei marcatori DArT. Il tutto al fine di validare le mappe di associazione e posizionarle sui cromosomi, associando i marcatori a caratteri d'interesse. Ulteriori studi citogenetici saranno interessanti per approfondire i riarrangamenti strutturali osservati nelle mappe genetiche DArT delle specie selvatiche rispetto alle specie coltivate.

L'utilizzo dei marcatori DArT nella genomica comparativa può rappresentare uno strumento di successo per generare risorse genetiche per lo studio e la caratterizzazione della struttura genomica di specie ancora poco esplorate, come quelle selvatiche. La disponibilità delle sequenze dei marcatori DArT, inoltre, facilita l'integrazione di tali mappe con i QTL per l'assemblaggio completo di risorse genetiche nell'ambito delle specie selvatiche di patata.

Conoscenze genomiche, come la disponibilità di sequenza, rappresentano attualmente una risorsa di valore inestimabile, che facilita di gran lunga la comprensione della funzionalità di un organismo. L'integrazione dei dati ricavati dalle analisi bioinformatiche con i dati derivati da rilievi sperimentali è ormai fondamentale per la comprensione della funzionalità dell'intero organismo o di specifici geni.

In conclusione l'approccio bioinformatico messo a punto per l'analisi delle mappe di associazione DArT è stato molto utile nell'analisi genomica comparativa tra *S. commersonii* e *S. bulbocastanum* e patata e pomodoro. Inoltre, ha messo in evidenza l'elevata specificità e l'affidabilità dei marcatori molecolari DArT, i quali hanno allineato per quasi la totalità della loro lunghezza, individuando regioni non ridondanti sui genomi di patata e pomodoro. Infine grazie a questo studio, è stato possibile identificare numerosi marcatori DArT associati a geni di resistenza e specifici delle specie selvatiche, che potranno essere molto utili nei programmi di selezione assistita positiva e negativa.

Capitolo 4

4.1 Introduzione

Tra le strategie più diffuse per l'ampliamento della base genetica dei genotipi coltivati di patata e l'ottenimento di nuove cultivar vi sono l'ibridazione sessuale e l'ibridazione somatica.

L'ibridazione sessuale interspecifica è un approccio molto importante per produrre nuova variabilità genetica, utile in programmi di *breeding* e in studi genetici. Essa consente l'introggressione di geni d'interesse provenienti dalle specie selvatiche; la produzione di genotipi che combinano cromosomi specifici, provenienti da due parentali; gli studi sulle alterazioni genomiche che avvengono durante la formazione degli ibridi (ad esempio i cambiamenti nell'espressione genica o nel contenuto genomico) e la verifica di ipotesi evolutive sulla speciazione vegetale (Jansky, 2009; Galván et al., 2010). Le strategie tipicamente adottate con l'ibridazione sessuale interspecifica sono rappresentate dallo sviluppo di incroci tra specie interfertili appartenenti allo stesso *gene pool* e aventi lo stesso numero cromosomico. Gli ibridi ottenuti presentano spesso alti livelli di eterosi, ovvero l'aumento della frequenza del numero di loci con alleli differenti per il gene che controlla lo stesso carattere e di conseguenza la superdominanza e l'esplosione del vigore dell'ibrido non solo dal punto di vista fenotipico ma anche da quello metabolico, fotosintetico ecc. (Birchler et al., 2010). In natura, l'origine di nuove specie a seguito dell'ibridazione interspecifica ha contribuito notevolmente allo sviluppo di specie di notevole interesse agrario, basti pensare al frumento, all'avena, al cotone, al tabacco che sono antichissimi allopoliploidi derivati da ibridi tra specie differenziate. Ulteriori esempi di ibridi interspecifici usati in agricoltura sono il caffè (*Coffea arabica* x *C. robusta*) la fragola (*Fragaria chiloensis* x *F. virginiana*) il tritcale (*Triticum spp.* x *Secale cereale*). Anche nel gruppo delle piante ornamentali sono numerose le varietà che traggono origine diretta da incroci interspecifici; la rosa, il giglio, le orchidee, la viola sono solo alcuni esempi. Numerose specie, inoltre, sono state prodotte artificialmente mediante ibridazione interspecifica per il trasferimento di caratteri utili, come i fattori di resistenza a malattie a stress ambientali o caratteri quantitativi, in piante coltivate, come ad esempio la resistenza ad oidio in avena, a *Cladosporium* in pomodoro ecc.

Data la presenza in natura di numerose barriere pre- e post- zigotiche, l'ibridazione sessuale è spesso limitata a cultivar all'interno di una specie o a poche specie strettamente correlate. Varie strategie possono consentire il superamento delle barriere di incompatibilità, tra cui l'adeguata scelta dei parentali entro lo stesso *gene pool*, l'utilizzo di particolari tecniche di impollinazione, il recupero dell'embrione e l'allevamento su substrato artificiale, l'ibridazione somatica, o ancora la manipolazione della ploidia e l'individuazione di specie che facciano da "ponte" tra specie più lontane (Soltis e Soltis, 2009).

L'ibridazione somatica presenta numerosi vantaggi. Consente, infatti, l'ottenimento di ibridi intergenerici o interspecifici superando le barriere di incompatibilità, permette la combinazione di due genomi nucleari eterozigoti senza ricombinazione meiotica, e il trasferimento di caratteri poligenici in un unico genotipo, nonché la produzione di riarrangiamenti e ricombinazioni del DNA citoplasmatico. Attraverso la fusione di cellule somatiche prive di parete mediante le colture *in vitro*, inoltre, da vita a un ibrido somatico tra piante appartenenti a specie e/o generi incompatibili nelle quali l'ibridazione per via sessuata è estremamente difficile o impossibile. L'ibrido somatico presenta caratteristiche genomiche combinate e nuove, altrimenti non ottenibili, data l'incompatibilità sessuale dei genotipi di partenza (Carputo et al., 2010). L'ibridazione somatica interspecifica è stata applicata in patata per l'introggressione di resistenze da specie selvatiche $2x(1EBN)$, come *S. brevidens* nel *gene pool* coltivato (Tek et al., 2004) e per migliorare i caratteri associati alla qualità da *S. bulbocastanum* ad aploidi di *S. tuberosum* (Iovene et al., 2011).

L'ibridazione interspecifica, sia sessuale che somatica, risulta molto utile nel migliorare le caratteristiche della patata coltivata tetraploide ($2n=4x=48$) attraverso il reperimento di geni dalle specie selvatiche, che rappresentano una fonte importante di caratteri di resistenza o qualità dei tuberi

In patata il superamento delle barriere di incompatibilità (dovute principalmente a differenze nell'EBN) tra le specie selvatiche e quelle coltivate, è stato ottenuto con successo adottando particolari accorgimenti e tecniche che hanno portato all'ottenimento di ibridi interspecifici. I metodi più comuni prevedono la manipolazione della ploidia e la riduzione o il raddoppiamento dell'EBN; in un caso mediante lo sviluppo di aploidi, nell'altro mediante la produzione di gameti $2n$ (Jansky, 2006). L'induzione della poliploidia (attraverso metodi sessuali o somatici) permette di superare l'ostacolo della degenerazione dell'endosperma ibrido. I poliploidi indotti possono, successivamente, essere utilizzati in incroci interspecifici, che talvolta prevedono la produzione di ploidie ponte (Carputo et al., 1997). Questi complessi schemi di incrocio possono comportare l'aggiunta o la perdita di uno o più cromosomi con la

produzione di gameti aneuploidi. La determinazione degli extracromosomi, in genere, viene effettuata tramite tecniche di citogenetica quali la “*Fluorescence in situ hybridization*” (FISH), “*Genomic in situ hybridization*” (GISH) e Giemsa C-banding (Hu et al., 2011). Gli aneuploidi possono rappresentare sia un vantaggio che uno svantaggio per il miglioramento genetico.

Tra le specie selvatiche di patata, *S. commersonii* ($2n=2x=24$) è stata ampiamente utilizzata presso i laboratori di genetica del DiSSPAPA in studi che precedono tale attività di ricerca (Carputo et al., 1997; Carputo, 1999; Carputo et al., 2007; Carputo et al., 2009; Iorizzo et al., 2011). Questa specie, infatti, presenta numerosi caratteri di resistenza. *S. commersonii* ha un valore di EBN pari a 1 e *S. tuberosum* ha un valore di EBN di 4 allo stadio tetraploide e di 2 allo stadio diploide. Pertanto a seguito degli incroci tra le due specie, l'endosperma degenera (Johnston et al., 1980). Per superare tali barriere di incompatibilità sono disponibili approcci di ingegneria genomica basati sulle ploidie ponte in cui il corredo cromosomico di *S. commersonii* è raddoppiato. Tali approcci sono stati utilizzati per ottenere il materiale vegetale su cui si basa l'attività di ricerca riportata in questo capitolo di tesi. La ploidia, e di conseguenza l'EBN, della specie selvatica *S. commersonii* è stata raddoppiata attraverso rigenerazione *in vitro* di espianti di foglia (Cardi et al., 1993). *S. commersonii* 4x(2EBN) così ottenuto, è stato incrociato con genotipi *S. tuberosum*-*S. phureja* 2x(2EBN) producendo ibridi fertili 3x(2EBN) (Carputo et al. 1995). Gli ibridi triploidi sono stati usati con successo in schemi di incrocio 3x x 2x che hanno prodotto ibridi aneuploidi. Gli ibridi triploidi 3x(2EBN) e gli aneuploidi ottenuti dagli incroci 3x x 2x, rappresentano il materiale di partenza dell'attività di ricerca qui riportata. Gli ibridi 3x x 2x mostrano non solo numerosi caratteri d'interesse ereditati dalla specie selvatica ma anche elevata variabilità in termini di numero cromosomico (Iorizzo et al., 2011).

La selezione di questi ibridi aneuploidi con i metodi classici, però, risulta molto difficile e lenta. Con l'attività di ricerca riportata in questo capitolo, è stata messa a punto una strategia innovativa per il rapido dosaggio, negli ibridi interspecifici triploidi e aneuploidi disponibili, dei cromosomi provenienti dalla specie selvatica *S. commersonii*. La strategia sviluppata ha previsto in primo luogo l'utilizzo dei marcatori molecolari *Conserved Ortholog Set II* (COSII) per l'identificazione e lo sviluppo di marcatori molecolari SNPs *S. commersonii* specifici e successivamente l'impiego della tecnologia *High Resolution Melting* (HRM) per il dosaggio cromosomico. Nei prossimi paragrafi saranno approfonditi questi due aspetti.

4.1.1 I marcatori *Conserved Ortholog Set II* (COSII)

Molti studi di genomica comparativa, sistematica e filogenetica dipendono dalla disponibilità di set di geni ortologhi. Sono definiti ortologhi i geni che condividono un progenitore comune durante il processo di speciazione (Wu et al., 2006); essi svolgono la stessa funzione in organismi diversi. L'identificazione di tali geni in pianta è complicata dal fatto che molti organismi vegetali sono paleo-poliploidi e durante la propria evoluzione hanno subito numerosi eventi di duplicazione (Blanc e Wolf, 2004). La crescente disponibilità di dati di sequenza di molte specie ha permesso sempre più l'identificazione di set di putativi geni ortologhi tra le specie (Fulton et al., 2002). Negli anni '90 l'elevata disponibilità di geni ortologhi in singola copia nell'ambito della stessa famiglia vegetale si contrapponeva alla difficoltà di identificare geni ortologhi che consentissero studi di genomica comparativa tra famiglie vegetali differenti. Con la disponibilità della sequenza del genoma di *Arabidopsis*, le informazioni di genomica funzionale sono diventate accessibili e utilizzabili nel paragonare e analizzare tutte le specie vegetali. Ciò ha portato anche all'identificazione di un set di geni conservati durante l'evoluzione, sia nella sequenza che nel numero di copie (Fulton et al., 2002).

I marcatori COS rappresentano un set di geni ortologhi identificati attraverso il paragone computazionale delle sequenze genomiche di *Arabidopsis* con le banche dati di EST (Expressed Sequence Tag) di pomodoro, che rappresentano il contenuto genico di quest'ultima specie. Per avere la certezza di evitare famiglie multi-geniche, sono stati selezionati esclusivamente gli allineamenti singoli. La maggioranza dei COS, inoltre, è stata testata anche per validare la presenza del marcatore ortologo nel genoma di pomodoro, in un numero di copie basso o in singola copia. Pomodoro e *Arabidopsis* sono entrambe dicotiledoni, ma appartengono a famiglie diverse (le *Solanaceae* e le *Brassicaceae*) distanziate nell'evoluzione circa 150 milioni di anni fa. E' proprio perché i genomi di *Arabidopsis* e pomodoro divergono molto presto nella storia evolutiva che i COS sono marcatori utili in studi tassonomici e di genomica comparativa di un vasta gamma di specie vegetali.

I marcatori molecolari COSII (*Conserved Ortholog Set II*) sono marcatori sviluppati da geni ortologhi, ovvero a singola copia, nelle *Solanaceae* e *Rubiaceae* e ancorati al genoma di *Arabidopsis*. Furono identificati da Wu et al. (2006) come Set II per distinguerli dal gruppo di marcatori COS riportati da Fulton et al. (2002), con i quali conservano caratteristiche comuni. Vengono usati per numerosi studi tra cui patata, pomodoro, melanzana, petunia, tabacco, caffè, lattuga, olivo, menta ecc.

L'elevata conservazione di sequenza tra i marcatori COS potrebbe suggerire anche una conservazione nel ruolo funzionale tra le specie. La completa annotazione funzionale dei COS è disponibile presso il sito <http://sgn.cornell.edu>. Ai COSII è stata assegnata un'annotazione funzionale sulla base degli allineamenti con i geni di *Arabidopsis*, il cui risultato ha messo in luce che la maggioranza dei COSII cade in geni che codificano per proteine mitocondriali o plastidiali, ma anche in geni che codificano per proteine coinvolte nel metabolismo del RNA o DNA. Tra i COSII sono poco rappresentati, invece, geni codificanti per proteine localizzate nella parete cellulare, chinasi, fattori trascrizionali e proteine coinvolte nella trasduzione del segnale. Data l'elevata conservazione di sequenza nell'ambito dei geni ortologi, è stato possibile sviluppare *primer* universali che consentano l'amplificazione mediante PCR degli ortologi tra le *Asteraceae*, anche per quelle di cui non si hanno informazioni di sequenza (Wu et al., 2006). Essi rappresentano così un'alternativa economica ad altri tipi di marcatori dominanti che richiedono la conoscenza della sequenza (Enciso-Rodriguez et al., 2010). Caratteristica peculiare di questi marcatori, quindi, è la loro semplicità d'uso, che richiede l'amplificazione e la visualizzazione dei risultati su gel d'agarosio basata su assenza/presenza delle bande (Wu et al., 2009a), nonché la presenza di *primer* universali che consentano l'amplificazione dei geni ortologi tra *Solanaceae* e *Rubiaceae* e altre specie rispetto a quelle in cui sono stati disegnati.

I COSII così ottenuti sono stati usati per la costruzione di mappe genetiche e in numerosi studi che mirano a identificare relazioni filogenetiche e sinteniche tra specie come pomodoro, melanzana e peperone (Wu et al., 2009a, Wu et al., 2009b), o per ottenere informazioni genetiche tra specie coltivate e selvatiche di tabacco (Wu et al., 2010). Inoltre, essendo i marcatori COSII ortologi, in singola copia e specifici di un determinato cromosoma, possono essere utilizzati (con opportune modifiche) anche in altre applicazioni come quella riportata in questo capitolo: l'analisi dei polimorfismi del singolo nucleotide tra le specie di patata e il disegno di nuovi marcatori interni ai COSII specifici e utili per il dosaggio cromosomico mediante la tecnica *High Resolution Melting*.

4.1.2 High Resolution Melting (HRM)

La classe più abbondante di marcatori molecolari nei genomi vegetali è rappresentata senza dubbio dai polimorfismi del singolo nucleotide (SNPs) (Rafalski et al., 2002), che sono mutazioni di una singola coppia di basi conservate durante l'evoluzione e molto utili nei saggi di genotipizzazione vegetale (Labate e Baldo, 2005). Tra le varie tecniche per l'identificazione

degli SNPs, l'HRM è piuttosto vantaggiosa rispetto alle altre perché è molto semplice, rapida ed economica. Per tali caratteristiche l'HRM è diventata un metodo molto usato nella genotipizzazione, nel dosaggio allelico e nell'identificazione di mutazioni, inclusi gli SNPs (De Koeyer et al., 2011). Si tratta di un saggio post-PCR condotto in presenza di un fluoroforo che si intercala nella doppia elica del DNA emettendo fluorescenza (De Koeyer et al., 2010). Quando lo strumento aumenta progressivamente la temperatura, il DNA si denatura rilasciando il fluoroforo. La progressiva riduzione di fluorescenza, dovuta all'aumento delle molecole di DNA sotto forma di singolo filamento non associato al fluoroforo, viene monitorata dallo strumento HRM, che colleziona con un'elevata precisione ottica e termica i segnali di fluorescenza, rielaborandoli direttamente sul computer ad esso collegato e fornendo come dato finale le cosiddette curve o profili di *melting* (Hofinger et al., 2009). Le curve di *melting* visualizzate alla fine dell'esperimento mostrano la riduzione della fluorescenza in funzione dell'aumento di temperatura (fig 4.1): ampliconi che hanno differenze nella sequenza hanno differenti temperature di denaturazione e, pertanto, presentano curve di *melting* differenti. Lo strumento inoltre fornisce anche un indice numerico di identità percentuale tra le curve paragonate. Tale sistema è utile per identificare le varianti alleliche, le mutazioni puntiformi che sono causa di numerose malattie genetiche (Wu et al., 2008) e, come per il presente lavoro di ricerca, per attribuire l'identità genetica di un campione ibrido paragonandolo ai parentali. La temperatura di *melting* è una delle caratteristiche usate per descrivere le differenze sulla base dei polimorfismi tra gli alleli. La temperatura di *melting* di una molecola di DNA a doppio filamento è definita come la temperatura a cui il 50% del DNA è sotto forma di singolo filamento. La coppia di nucleotidi CG, per essere denaturata, ha bisogno di temperature di *melting* più elevate rispetto alla coppia AT; frammenti di DNA con una più elevata composizione in CG, quindi, necessitano di una temperatura di denaturazione maggiore (Yuan et al., 2008).

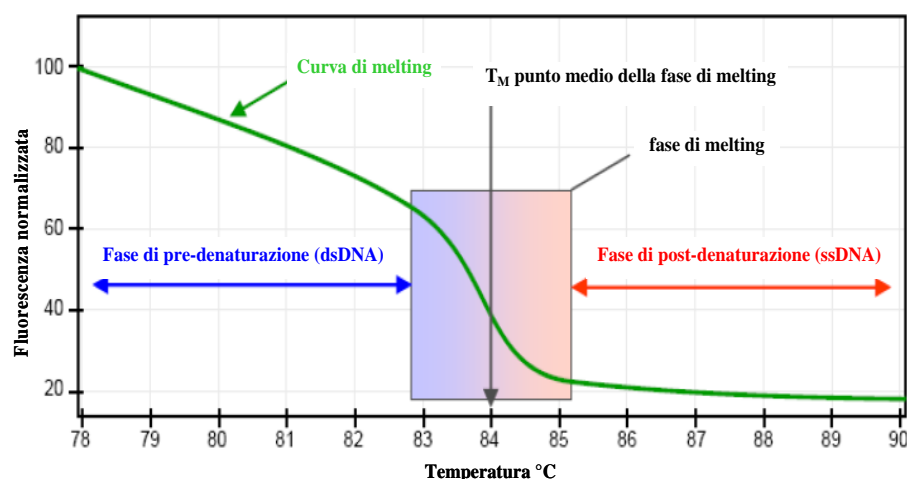


Figura 4.1: Tipica curva di *melting* che mostra la diminuzione della fluorescenza (asse ordinate) in funzione dell'aumento della temperatura (asse ascisse). La curva di *melting* tracciata in verde presenta una fase che precede la denaturazione (freccia blu), che con l'aumento della temperatura comporta una diminuzione della fluorescenza fino alla fase di post denaturazione (freccia rossa) dove tutti i frammenti di DNA sono sottoforma di singolo filamento.

La tecnica HRM richiede solo l'uso di reagenti PCR standard e di un colorante di terza generazione, ossia intercalare del doppio filamento di DNA, senza eventi di riallocazione durante la dissociazione. I coloranti intercalari di terza generazione, come SYTO 9 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA), LC Green (Idaho Technologies, Salt Lake City, UT) ed Eva Green (Biotium Inc, Hayward, CA), sono stati utilizzati con successo nelle analisi HRM condotte con il Rotor-Gene 6000. Questi coloranti hanno una tossicità molto inferiore rispetto ai coloranti di seconda generazione e quindi, per una migliore saturazione dei campioni di DNA a doppio filamento, possono essere utilizzati a concentrazioni maggiori rispetto agli altri. La sensibilità del metodo HRM, oltre che al colorante, è anche dovuta alla transizione di temperatura altamente controllata e al fatto che gli amplificati PCR analizzati sono in genere molto corti (150-250 basi).

Numerosi sono i vantaggi della tecnologia HRM. Si tratta di una metodologia molto semplice, dato che tutto il saggio si svolge in un unico tubicino, senza la necessità di modifiche aggiuntive post-PCR per gli ampliconi che devono subire il processo di denaturazione. E' inoltre molto rapida, dato che sono richiesti solo alcuni minuti per generare i profili di *melting*; è anche piuttosto economica per il basso costo dei reagenti e per il fatto che in un unico saggio possono essere analizzati più campioni contemporaneamente. L'HRM non richiede poi analisi elettroforetiche su gel, né cromatografia liquida dei campioni che alla fine del saggio, non essendo distrutti, sono resi disponibili per analisi di sequenziamento, per determinare la natura e la posizione del polimorfismo individuato (Hofinger et al., 2009).

4.1.3 Obiettivi

Presso i laboratori del DiSSPAPA, attraverso approcci di ingegneria genomica, il genoma della specie selvatica diploide *S. commersonii* è stato introgresso in quello di *S. tuberosum* e *S. phureja*. Sono stati prodotti numerosi ibridi con ploidia e numero cromosomico molto variabile. Insieme a ibridi triploidi pentaploidi, infatti, sono stati considerati genotipi aneuploidi a livello triploide e tetraploide (Figura 4.2).

Lo sviluppo di sistemi di cariotipizzazione basati sui marcatori molecolari cromosoma- e specie-specifici si presenta come un metodo molto utile per la caratterizzazione di questi materiali e per l'approfondimento delle conoscenze sui meccanismi d'interazione tra i genomi sessualmente incompatibili. L'aumentare delle conoscenze su tale materiale ibrido, inoltre, consentirebbe il loro più rapido utilizzo per il miglioramento genetico della patata coltivata.

L'obiettivo dell'attività di ricerca riportata in questo capitolo è rappresentato dallo sviluppo di un metodo semplice e rapido per definire il dosaggio cromosomico di ibridi ipotriploidi tra *S. commersonii* e *S. tuberosum*. A tal proposito sono stati sviluppati marcatori molecolari COSII *S. commersonii* specifici da utilizzare nella tecnica *High Resolution Melting*. I risultati ottenuti hanno consentito di attribuire l'identità genetica agli ibridi, determinando la natura degli extracromosomi e valutando la quantità di genoma selvatico in essi presente.

4.2 Materiali e Metodi

4.2.1 Materiale vegetale

Il materiale vegetale usato in questo studio era rappresentato da 21 ibridi interspecifici di patata, di cui 5 triploidi e 16 aneuploidi, prodotti mediante lo schema di incrocio riportato nella figura 4.2. A questi ibridi sono stati aggiunti i quattro parentali: *S. commersonii*, *S. tuberosum* cv. Blondy, l'ibrido *S. phureja* – *S. tuberosum* clone UP88P5 e *S. phureja* clone IVP35. Il corredo cromosomico e il codice dei materiali utilizzati sono riportati in Tabella 4.1. I parentali degli ibridi sono stati usati per lo sviluppo di marcatori COSII *S. commersonii*-specifici, mentre tutto il materiale vegetale descritto è stato usato in esperimenti di HRM per la valutazione del dosaggio cromosomico.

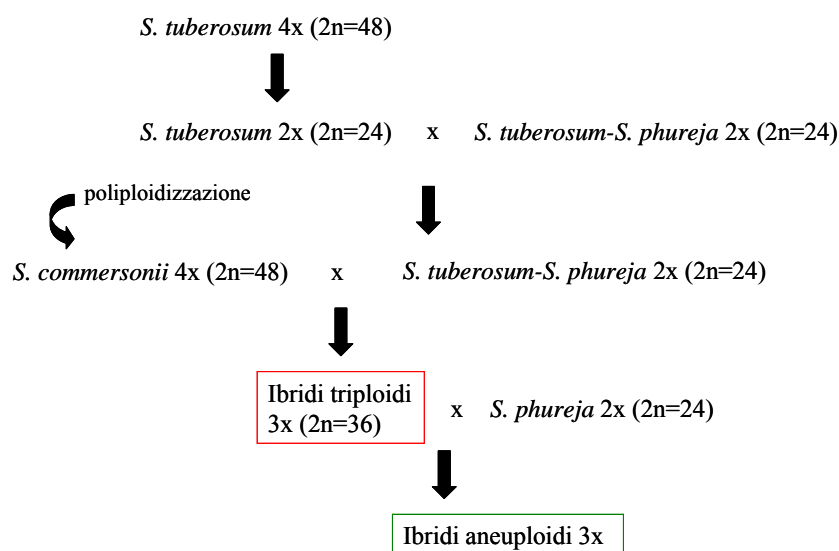


Figura 4.2: Schema d'incrocio seguito per l'ottenimento degli ibridi triploidi e aneuploidi utilizzati nel progetto di ricerca. Per ogni specie è riportato il livello di ploidia e il numero di cromosomi somatici.

Tabella 4.1 Elenco dei parentali e degli ibridi interspecifici triploidi e aneuploidi utilizzati negli esperimenti di dosaggio cromosomico. Per ogni ibrido è riportato il codice identificativo ed il numero di cromosomi somatici nonché l'origine. *S. tbr* indica *S. tuberosum*, *S. phu* indica *S. phureja*, *S. cmm* indica *S. commersonii*.

Parentali			
Codice	Numero cromosomico	Femminili	Maschili
Ibridi 3x			
MCA1	36	<i>S. tbr-S. phu</i>	<i>S. cmm</i>
MCB1	36	<i>S. tbr-S. phu</i>	<i>S. cmm</i>
MCB3	36	<i>S. tbr-S. phu</i>	<i>S. cmm</i>
MCB10	36	<i>S. tbr-S. phu</i>	<i>S. cmm</i>
MCC1	36	<i>S. tbr-S. phu</i>	<i>S. cmm</i>
Ibridi 3x x 2x			
MCF1	35-36	<i>S. tbr-S. cmm-S. phu</i>	<i>S. phu</i>
MCH1	33	<i>S. tbr-S. cmm-S. phu</i>	<i>S. phu</i>
MCH11	32	<i>S. tbr-S. cmm-S. phu</i>	<i>S. phu</i>
MCH2	32	<i>S. tbr-S. cmm-S. phu</i>	<i>S. phu</i>
MCH5	33	<i>S. tbr-S. cmm-S. phu</i>	<i>S. phu</i>
MCL4	33	<i>S. tbr-S. cmm-S. phu</i>	<i>S. phu</i>
MCM1	33	<i>S. tbr-S. cmm-S. phu</i>	<i>S. phu</i>
MCM4	33	<i>S. tbr-S. cmm-S. phu</i>	<i>S. phu</i>
MCM5	31	<i>S. tbr-S. cmm-S. phu</i>	<i>S. phu</i>
MCM8	33	<i>S. tbr-S. cmm-S. phu</i>	<i>S. phu</i>
MCN1	33	<i>S. tbr-S. cmm-S. phu</i>	<i>S. phu</i>
MCN2	33	<i>S. tbr-S. cmm-S. phu</i>	<i>S. phu</i>
MCN3	33	<i>S. tbr-S. cmm-S. phu</i>	<i>S. phu</i>
MCQ1	32	<i>S. tbr-S. cmm-S. phu</i>	<i>S. phu</i>
MCQ2	33	<i>S. tbr-S. cmm-S. phu</i>	<i>S. phu</i>
MCY3	31	<i>S. tbr-S. cmm-S. phu</i>	<i>S. phu</i>

Il materiale vegetale utilizzato era già disponibile presso la banca di germoplasma della Sezione di Genetica Agraria del Dipartimento delle Scienze del Suolo, della Pianta, dell'Ambiente e delle Produzioni Animali dell'Università degli Studi di Napoli Federico II.

Le piante di ciascun genotipo sono state prelevate da uno stock genetico conservato *in vitro* in camera di crescita a 7°C, su substrato contenente sali di MS (Murashige e Skoog, 1962), con l'aggiunta di 10 gl-1 di saccarosio, 8 gl-1 di agar e avente un pH di 5.8. Per ogni genotipo è stato prelevato un numero variabile di espianti. Essi sono stati micropropagati *in vitro* su substrato artificiale MS includente 30 gl-1 di saccarosio e disposti nelle condizioni migliori di crescita ovvero a 27 °C, con un fotoperiodo di 16 ore al giorno di luce artificiale, 8 di buio e

4000 lux di intensità luminosa fotosinteticamente attiva e garantita da lampade a luce fluorescente. Dopo tre settimane le vitro-piante che presentavano una soddisfacente proliferazione di germogli e radici sono state trasferite *in vivo* in una camera di crescita climatizzata. Dopo 10-15 giorni di acclimatamento le piantine sono state trasferite in serra. In queste condizioni è stato ottenuto un numero sufficiente di piante dalle quali è stato possibile prelevare il materiale necessario per le analisi molecolari programmate.

4.2.2 Estrazione del DNA

Il materiale vegetale così ottenuto è stato sottoposto a estrazione del DNA genomico mediante il Kit commerciale *DNeasy® Plant Mini Kit*, fornito dalla Qiagen. Il DNA estratto è stato quantificato con lo spettrofotometro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, LLC, Wilmington, DE) e conservato a -20°C. L'integrità del DNA estratto è stata valutata su gel di agarosio all'1.5%.

Il DNA genomico ottenuto è stato utilizzato nella messa a punto di un metodo analitico per la determinazione del dosaggio cromosomico degli ibridi interspecifici. Tale metodologia ha previsto le seguenti fasi sperimentali:

- 1) selezione e amplificazione dei marcatori COSII;
- 2) purificazione e sequenziamento degli amplificati PCR;
- 3) sviluppo dei marcatori COSII specifici della specie selvatica *S. commersonii*;
- 4) messa a punto del saggio HRM e dosaggio cromosomico degli ibridi.

4.2.3 Selezione dei marcatori COSII (*Conserved Ortholog Set II*) ed amplificazione PCR

I 61 marcatori molecolari COSII utilizzati nella presente attività di ricerca sono stati selezionati presso il *SOL Genomics Network* (<http://sgn.cornell.edu>), rilevante risorsa di informazioni di genomica per la famiglia delle *Solanaceae* (Mueller et al., 2005). Per ciascuno dei 12 cromosomi di patata sono stati scelti dai 3 agli 8 marcatori aventi una lunghezza compresa tra i 525 e 950 nucleotidi. Le caratteristiche dei marcatori sono descritte nella tabella 4.2.

Tabella 4.2 Caratteristiche dei marcatori molecolari COSII selezionati. Viene riportato il cromosoma su cui i marcatori sono localizzati, il codice di identificazione, la dimensione del marcatore e la temperatura di *annealing* (Ta) riportata sul sito MWG e quella sul sito SGN. Il simbolo -/- indica l'assenza del dato.

Cromosoma	Codice	Dimensione marcatore (bp)	Ta (°C) MWG Fw/Rv	Ta (°C) SGN
1	COSII 1-1	750	-/-	57
	COSII 1-4	850	-/-	57
	COSII 1-5	850	-/-	56
	COSII 1-7	650	61.6/62.4	55
	COSII 1-8	600	59.8/58.9	55
2	COSII 2-1	950	64.8/61.9	55
	COSII 2-2	780	-/-	56
	COSII 2-3	700	61.0/58.9	55
	COSII 2-4	650	64.6/60.4	55
	COSII 2-5	600	61.6/61.9	55
3	COSII 3-5	650	62.4/64.8	55
	COSII 3-6	650	61.3/63.2	55
	COSII 3-7	625	62.1/64.2	55
	COSII 3-8	600	63.4/62.2	55
4	COSII 4-5	570	60.3/59.7	55
	COSII 4-6	600	64.6/63.4	55
	COSII 4-7	550	61.0/62.4	55
	COSII 4-8	500	58.9/61	55
5	COSII 5-2	850	-/-	55
	COSII 5-3	650	59.3/59.3	55
	COSII 5-4	650	62.4/56.9	55
	COSII 5-5	600-750	60.3/61.8	55
	COSII 5-6	650	62.7/61	58
6	COSII 6-3	750	-/-	55
	COSII 6-5	650	62.1/60.3	55
	COSII 6-6	650	61.0/58.5	53
	COSII 6-7	650	58.9/61.6	55
	COSII 6-8	675	60.1/61.6	55
7	COSII 7-1	850	61.0/66	55
	COSII 7-2	950	64.4/62.7	55
	COSII 7-5	580	63.2/66.4	55
	COSII 7-6	575	61.6/61.6	55
	COSII 7-7	575	61.6/61	55
8	COSII 8-4	850	-/-	55
	COSII 8-6	650	61.6/63.4	55
	COSII 8-7	625	66.5/61.9	55
	COSII 8-8	600	61.3/59.7	55
	COSII 8-9	525	63.4/61	55
9	COSII 9-3	900	64.4/56.9	53
	COSII 9-4	600	62.1/63	55
	COSII 9-5	625	63.4/57.8	55

	COSII 9-6	550	61.3/65	55
10	COSII 10-2	750	-/-	55
	COSII 10-4	750	-/-	55
	COSII 10-5	500	56.9/59.3	55
	COSII 11-2	850	-/-	50
11	COSII 11-3	650	58.4/61	55
	COSII 11-4	650	63.0/61.9	58
	COSII 11-5	600	62.7/63.4	55
	COSII 11-6	650	62.4/66.4	55
	COSII 12-1	750	-/-	55
12	COSII 12-4	850	-/-	55
	COSII 12-5	850	-/-	55
	COSII 12-7	850	58.5/59.7	55
	COSII 12-8	650	57.8/63.9	55
	COSII 12-9	650	55.9/64.2	55
	COSII 12-10	550	61.3/61.6	55
	COSII 12-11	525	61.3/61.3	55

A seguito di tale selezione, i marcatori COSII sono stati utilizzati per l'amplificazione PCR dei quattro genotipi parentali degli ibridi (*S. commersonii*, Blondy, UP88P5 e IVP35). La PCR è stata allestita con una miscela di reazione di 25 µl di volume finale contenente *primer Forward* e *Reverse* alla concentrazione di 0.2 µM; dNTPs (0.8 mM); taq-polimerasi (1U); Buffer PCR 1X (10 mM Trizma-HCl, pH 8.3 at 25 °C, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂); DNA (30 ng); MgCl₂ (1.5 mM). Il ciclo di amplificazione PCR utilizzato ha previsto un'incubazione a 94°C per 30 secondi, 30 cicli di denaturazione a 94°C per 10 secondi, 60 secondi alla temperatura di *annealing* dei *primer* e una fase di estensione a 72°C della durata di 120 secondi, e un ciclo finale di 72°C per 10 secondi.

Al termine della reazione di amplificazione, i campioni sono stati visualizzati mediante gel di agarosio all'1% in Buffer TAE 1X. Per ogni coppia di *primer* è stato fondamentale ottenere un amplificato presente in tutti e quattro i parentali e privo di aspecifici.

4.2.4 Purificazione e sequenziamento degli amplificati PCR

La purificazione dei frammenti amplificati è stata condotta secondo due tipi di procedure. La prima, direttamente da prodotto PCR, è stata adottata per amplificati unici e privi di aspecifici; la seconda procedura, da gel d'agarosio, è stata adottata per amplificati PCR accompagnati da aspecifici, che non è stato possibile eliminare attraverso le variazioni delle condizioni di amplificazione.

La purificazione da prodotto di PCR è stata effettuata tramite l'*High Pure PCR Product Purification Kit* fornito dalla ROCHE, basato sulla presenza di sali caotropici che consentono di legare selettivamente gli ampliconi alle fibre di vetro speciali presenti sul filtro delle colonnine pre-impaccate/*High Pure Filter Tube*. La purificazione da gel d'agarosio è stata effettuata tramite il kit commerciale *QIAquick Gel Extraction Kit* fornito dalla QIAGEN.

Il DNA purificato, è stato conservato a -20°C nell'attesa di essere utilizzato. Le sequenze purificate sono state quantificate sia su gel d'agarosio al 1% in TAE buffer, sia con l'ausilio di uno spettrofotometro NanoDrop ND-1000 /NanoDrop Technologies, LLC, Wilmington, DE al fine di ottenere un preciso valore di concentrazione e valutare la qualità del prodotto purificato.

I campioni amplificati, purificati e quantificati sono stati sequenziati presso la piattaforma tecnologica GenoPom del DiSSPAPA (<http://wpage.unina.it/genopom>) a Portici mediante la tecnologia BigDye Terminator con il sequenziatore ABI PRISM 310 Genomic Analyzer.

4.2.5 Sviluppo dei marcatori COSII specie-specifici

Le sequenze ottenute sono state analizzate con il programma SeqScape Software v.2.5 (Applied Biosystem), che ha permesso l'allineamento delle sequenze *Forward* e *Reverse* di ciascuno dei quattro genotipi parentali contro la sequenza consensus della specie selvatica *S. commersonii*, in modo da localizzare regioni polimorfiche nei confronti di quest'ultima.

A seguito di tale allineamento sono state ricercate mutazioni puntiformi SNP assenti in *S. commersonii* e presenti negli altri tre parentali, Blondy, UP88P5 e IVP35. Con l'ausilio del software PRIMER3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), a monte e a valle di tali SNP *S. commersonii*-specifici, sono stati disegnati *primer* successivamente sintetizzati presso l'Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland).

I *primer* disegnati sono stati testati tramite una reazione PCR con ciclo e condizioni di reazione analoghe a quelle utilizzate per i marcatori COSII. A seguito dell'esito positivo di tale PCR, i marcatori *S. commersonii* specifici sono stati utilizzati per determinare, tramite HRM, il dosaggio dei cromosomi della specie selvatica *S. commersonii* negli ibridi disponibili.

4.2.6 Messa a punto dell'*High Resolution Melting* (HRM)

I marcatori COSII *S. commersonii*-specifici sono stati utilizzati nella reazione PCR per la tecnica del HRM, eseguita con lo strumento Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science). Il saggio HRM è stato eseguito sugli stessi campioni e subito dopo il completamento della reazione PCR; questa, oltre ai normali reagenti PCR, ha previsto l'uso del intercalante di terza generazione Eva Green (Biotium Inc, Hayward, CA). La metodica ha previsto l'allestimento di una reazione PCR in 25 µl finali contenente i seguenti componenti: *primer Forward* e *Reverse* alla concentrazione di 0.4 µM; dNTPs (0.8 mM); *taq*-polimerasi (1U); Buffer PCR 1X; 2 µl di DNA 40 ng; 1.25 µl di Eva-Green. Il ciclo di amplificazione utilizzato è riportato di seguito:

94°C per 30 secondi	X	1 ciclo
94°C per 10 secondi	}	X 30 cicli
Ta°C per 30 secondi		
72°C per 30 secondi		
72°C per 10 secondi	X	1 ciclo

Al termine della reazione PCR, per il completamento della HRM, è stata prevista una fase di denaturazione graduale dei campioni, in un intervallo di temperatura compreso tra 60°C a 90°C con un incremento di 0.1°C. E' in questa fase che sono state acquisite le informazioni utili nel differenziare i campioni che, avendo sequenze diverse anche per un solo nucleotide, hanno presentato differenti temperature di denaturazione o *melting*.

Il primo grafico che è stato visualizzato al termine del saggio HRM è stato quello relativo all'andamento della reazione di amplificazione, che rapporta la fluorescenza con i cicli di reazione. Affinché un ciclo sia ottimale, esso deve presentare un aumento del segnale di fluorescenza tra 20-25 cicli, mentre il controllo negativo deve avere una curva molto bassa ad indicare che non c'è stata amplificazione (figura 4.3). E' importante sottolineare come ognuna delle curve colorate presenti in figura 4.3 indichi l'andamento nel saggio HRM di un unico campione.

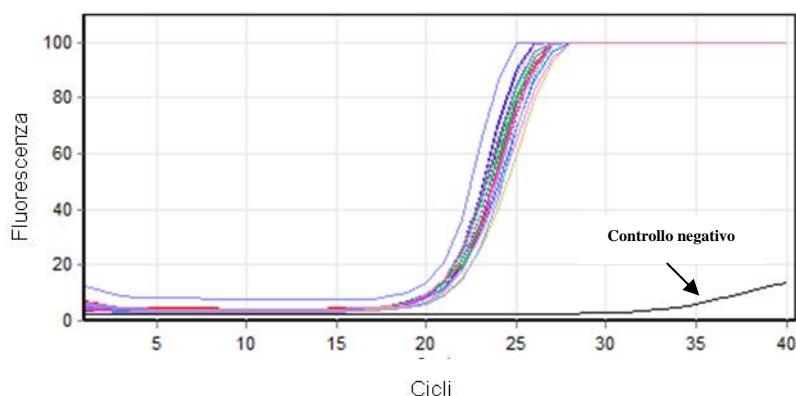


Figura 4.3: Grafico che indica l'andamento della reazione di amplificazione. Relaziona l'aumento della fluorescenza con il numero di cicli della reazione. Ogni curva colorata indica un campione analizzato.

Il secondo grafico importante è stato quello delle curve di *melting* (figura 4.4), che relaziona l'aumento della temperatura espresso in gradi centigradi (figura 4.4 asse delle ascisse) con il rapporto tra la variazione di fluorescenza e temperatura espresso come dF/dT (figura 4.4 asse delle ordinate). In corrispondenza dell'apice della curva è possibile conoscere la temperatura di denaturazione dei frammenti di DNA amplificati; a sinistra delle curve, inoltre, compare il rumore di fondo della reazione detto "a dente di sega" causato dalla doppia elica di DNA. Nel caso in cui la curva non sia unica e a monte della stessa sia presente un piccolo picco, quest'ultimo indica la presenza di ibridazioni di DNA differenti nelle miscele di PCR amplificate o la presenza di dimeri di *primer*. L'ottenimento di picchi molto bassi in questo grafico, invece, indica la presenza di etero duplex.

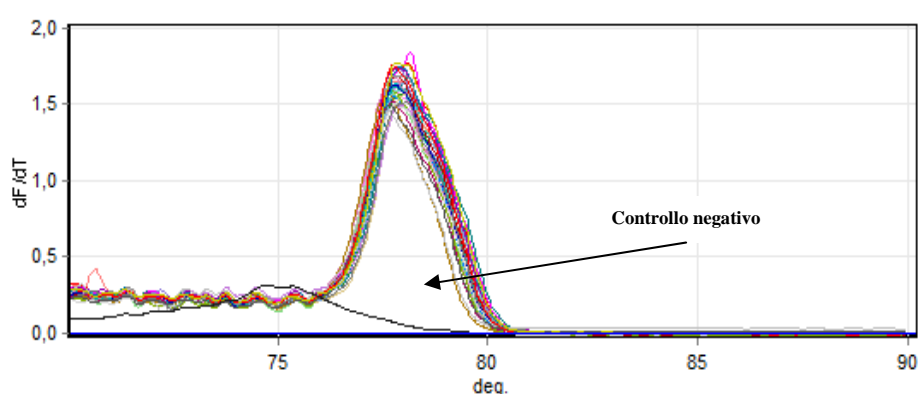


Figura 4.4: Grafico dell'analisi delle curve di *melting*.

Infine, per l'analisi dei dati del saggio HRM è stato necessario lavorare su grafici come quelli riportati in figura 4.5, in cui viene visualizzata una tipica curva HRM contenente i dati grezzi e le regioni di normalizzazione. Nell'interfaccia grafica sono stati forniti due cursori che consentono di normalizzare la fluorescenza all'inizio e alla fine delle curve di dissociazione.

Affinché il saggio HRM dia risultati di analisi soddisfacenti, è necessario che le curve visualizzate originino entro uno stesso intervallo di fluorescenza che non sia molto ampio (asse y, figura 4.5). Durante l'osservazione delle curve è stato importante valutare i seguenti casi: la sovrapposizione delle curve, che indicava sequenze identiche; il parallelismo delle curve, che denotava la presenza di una trans versione; l'incrocio in un qualsiasi punto, che indicava la presenza di una transizione. Tramite lo scorrimento delle due regioni di normalizzazione lungo la curva HRM è stato possibile normalizzare ogni campione in maniera individuale.

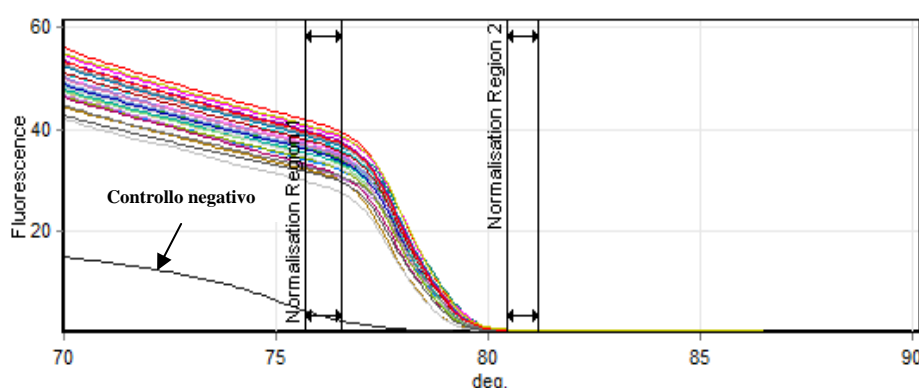


Figura 4.5: Grafico modello delle curve di analisi HRM.

L'analisi comparativa di normalizzazione, effettuata contemporaneamente su più campioni, ha consentito di ottenere dati percentuali sulla similarità tra i campioni ed i controlli positivi presi in considerazione; i dati sono stati riportati dal software di analisi come percentuale di confidenza. L'indice numerico di identità, ottenuto dal paragone delle curve di *melting* degli ibridi con i campioni controllo, ha consentito di valutare la percentuale di identità/similitudine della regione amplificata con i marcatori COSII *S. commersonii* specifici per quel determinato cromosoma. Questo a sua volta ha consentito di dosare il genoma di *S. commersonii* in ognuno dei cromosomi degli ibridi. Per ogni cromosoma di ogni ibrido analizzato è stato, infatti, allestito un esperimento HRM diverso.

I quattro genotipi parentali hanno rappresentato i controlli positivi contro cui sono stati normalizzati gli ibridi aneuploidi e triploidi. Per gli ibridi triploidi era atteso il dosaggio cromosomico di 1/3 del genoma di *S. tuberosum* e di 2/3 di *S. commersonii*. Per gli ibridi aneuploidi era atteso invece una minore quantità di cromosomi di *S. commersonii* rispetto alle altre specie parentali utilizzate nell'incrocio. I marcatori molecolari *S. commersonii*-specifici disegnati sono stati testati per HRM sui genotipi riportati in tabella 4.1 e su sette miscele di DNA ottenute in laboratorio e caratterizzate da rapporti quantitativi diversi di DNA dei genotipi parentali. Per le miscele sintetizzate sono state usate le seguenti abbreviazioni: C = DNA di *S.*

commersonii; T = DNA di *S. tuberosum* e P = DNA di *S. phureja*. Le sette miscele di DNA usate come materiale genetico di controllo sono riportate di seguito:

- il DNA dei genotipi C:T miscelati nel rapporto di DNA 2:1;
- il DNA dei genotipi C:T miscelati nel rapporto di DNA 1:2;
- il DNA dei genotipi C:T miscelati nel rapporto di DNA 1:1;
- il DNA dei genotipi C:P miscelati nel rapporto di DNA 2:1;
- il DNA dei genotipi C:P miscelati nel rapporto di DNA 1:2;
- il DNA dei genotipi C:P miscelati nel rapporto di DNA 1:1;
- il DNA dei genotipi C:T:P miscelati nel rapporto di DNA 1:1:1

Ad esempio il rapporto C:T 2:1 sta ad indicare che, nella miscela finale di materiale genomico, 2/3 di DNA appartengono alla specie *S. commersonii* e 1/3 a *S. tuberosum*. Tale rapporto era atteso ad esempio, per gli ibridi triploidi.

4.3 Risultati

Dei 61 marcatori COSII selezionati, 48 sono stati testati tramite PCR sui genotipi parentali degli ibridi da analizzare per HRM. Ventisette marcatori, a seguito della PCR, hanno dato un singolo amplificato (monomorfo) su elettroforesi in gel d'agarosio, 14 marcatori hanno portato all'amplificazione di due o più regioni (polimorfici) e pertanto non sono stati utilizzati nelle analisi successive, 7 COSII non hanno dato alcun risultato. Tra i 27 marcatori monomorfici, 12 sono stati sequenziati con successo. In figura 4.6 è riportato un esempio di visualizzazione del risultato delle analisi PCR su gel d'agarosio. Sono stati riportati 2 dei dodici amplificati monomorfici sequenziati (marcatori COSII 5-3, COSII 6-5) e un amplificato polimorfico (marcatore COSII 10-4), ottenuti mediante PCR sui quattro genotipi parentali. Il confronto dell'amplificato COSII con il marcatore di peso molecolare 1kb+ è stato utile per stabilire il peso molecolare dell'amplificato e la reale corrispondenza dello stesso alla sequenza COSII di interesse. Per ognuno dei 48 marcatori COSII utilizzati in questo studio, attraverso analisi PCR, è stata individuata la temperatura ottimale di *annealing*. I risultati sono riportati nella tabella 4.3.

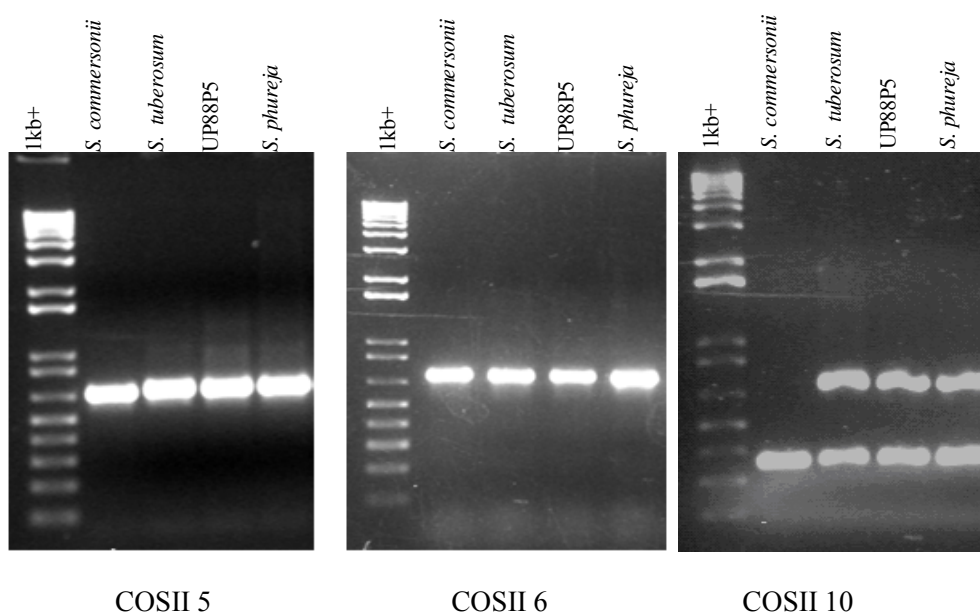


Figura 4.6: Visualizzazione su gel d'agarosio al 1% dei prodotti PCR ottenuti mediante i marcatori COSII monomorfici (COSII 5 e COSII 6) e polimorfici (COSII 10) sui cromosomi 5, 6 e 10. In alto sono riportati i quattro genotipi parentali *S. commersonii*, *S. tuberosum*, UP88P5 ibrido *S. phureja* - *S. tuberosum* e, infine, *S. phureja*, è poi riportato il marcatore di peso molecolare 1kb.

Tabella 4.3 Temperature di *annealing* identificate per ogni marcatore COSII. E' riportato il cromosoma sul quale è amplificato il marcatore COSII, il codice identificativo, la grandezza in coppie di basi (bp) e la temperatura di *annealing* identificata in °C.

Cromosoma	Marcatore	Dimensione (bp)	Temperatura di <i>annealing</i> testata (°C)
1	COSII 1-1	750	57
	COSII 1-4	850	57
	COSII 1-5	850	56
	COSII 2-1	950	59
	COSII 2-2	780	56
2	COSII 2-3	700	55,5
	COSII 2-4	650	58
	COSII 2-5	600	56
3	COSII 3-5	650	56
	COSII 3-6	650	58
	COSII 3-7	625	57
	COSII 3-8	600	58
4	COSII 4-5	570	58
	COSII 4-6	600	58
	COSII 4-7	550	60
	COSII 4-8	500	58
5	COSII 5-2	850	55/58
	COSII 5-3	650	56
	COSII 5-4	650	57
	COSII 5-5	600-750	62
	COSII 5-6	650	61
6	COSII 6-3	750	58
	COSII 6-5	650	55
	COSII 6-6	650	59
	COSII 6-7	650	58
	COSII 6-8	675	60

Cromosoma	Marcatore	Dimensione (bp)	Temperatura di <i>annealing</i> testata (°C)
7	COSII 7-1	850	59
	COSII 7-2	950	60
	COSII 7-5	580	60
	COSII 7-6	575	60
	COSII 7-7	575	59
8	COSII 8-4	850	55
	COSII 8-6	650	57
	COSII 8-7	625	57
	COSII 8-8	600	59
	COSII 8-9	525	62
9	COSII 9-3	900	59
	COSII 9-4	600	57
	COSII 9-5	625	55/58
	COSII 9-6	550	55/58
10	COSII 10-2	750	56
	COSII 10-4	750	57
	COSII 10-5	500	55/58
11	COSII 11-2	850	56
	COSII 11-3	650	57
	COSII 11-4	650	58
	COSII 11-5	600	58
	COSII 11-6	650	60
12	COSII 12-4	850	57
	COSII 12-5	850	56
	COSII 12-7	850	57
	COSII 12-8	650	57

Dall'analisi di sequenza degli amplificati è stato possibile identificare oltre 150 mutazioni, di cui 6.5% è rappresentato da inserzioni, il 32.7% da delezioni e il 97% da SNP (Tabella 4.4). Tutti gli SNP sono rappresentati da sostituzioni nucleotidiche e la maggioranza di essi (69%) è risultata specifica delle specie selvatica *S. commersonii*. Ciò ha consentito di disegnare *primer S. commersonii*-specifici che identificano marcatori molecolari *S. commersonii*-specifici.

Tabella 4.4 Analisi di sequenza effettuata sugli amplificati ottenuti con marcatori COSII e numero di polimorfismi individuati con l'allineamento.

Cromosoma	COSII	Lunghezza marcatore (nro)	SNPs (nro)	Inserzioni (nro)	Delezioni (nro)	SNP <i>S. commersonii</i> - specifici (nro)
1	COSII1-4	461	33	0	3	31
2	COSII2-2	545	13	0	0	11
3	COSII3-5	502	12	1	0	10
4	COSII4-6	301	8	0	0	6
5	COSII5-3	594	30	0	0	12
6	COSII6-5	156	10	0	0	8
8	COSII8-6	630	18	0	2	8
9	COSII9-4	590	23	0	0	15
		Totali	147	1	5	101

Sulla base delle analisi di polimorfismo effettuate sugli otto marcatori riportati in tabella 4.4 sono stati disegnati marcatori molecolari COSII *S. commersonii*-specifici da utilizzare nel dosaggio cromosomico mediante HRM. In tabella 4.5 sono riportati i marcatori COSII *S. commersonii*-specifici utilizzati. Essi sono il risultato di un accurato lavoro di “screening” mediante PCR e HRM, che ha portato alla selezione dei marcatori con caratteristiche migliori tra i circa sei marcatori per cromosoma disegnati su ognuno degli otto cromosomi COSII analizzati e riportati in tabella 4.4. I marcatori riportati in tabella 4.5 hanno presentato amplificato monomorfo e ottime prestazioni e attendibilità dei dati HRM. Pertanto sono stati utilizzati nel dosaggio cromosomico degli ibridi disponibili.

Tabella 4.5 Caratteristiche dei marcatori *S. commersonii*-specifici utilizzati nell'HRM per il dosaggio cromosomico degli ibridi. E' riportato il cromosoma sul quale è mappato il marcatore, il codice identificativo assegnato al marcatore COSII *S. commersonii*-specifico, la sequenza, la lunghezza in coppie di basi (bp), la e la temperatura di *annealing* (Ta) dei *primer*, nonché la grandezza dell'amplificato e il numero di SNP da esso contenuti

Cromosoma	Codice	Sequenza <i>primer</i>	Lunghezza (bp) Fw(Rv)	Ta°C Fw(Rv)	Grandezza amplificato (bp)	SNPs (nro)
1	COSII1-4c	Fw_TTGGGATTGAGGTGTGGTTC Rv_TCCCACCCATAATAAAGAACA	20(21)	60.76(56.98)	144	6
2	COSII2-2c	Fw_AAGATCCTGAAATTCGATCCAT Rv_TCCCTGGTAAACAAAATGAGC	22(21)	58.92(59.08)	140	2
3	COSII3-5b	Fw_CCAAAATGTTAACCAGATTTCCT Rv_GCAGTTTGTTCCTTTTAGTG	22(23)	57.19(57.29)	139	2
4	COSII4-6c	Fw_TTGGTCAAGACATCCTATTATTC Rv_ATTCCTGAGACCAAATCAATTTC	23(23)	55.05(58.51)	115	1
5	COSII5-3c	Fw_GCATGGTCTCCATCTTAGTGAA Rv_TGCCTATTGGATTCAAGCAA	22(20)	59.20(59.26)	100	3
6	COSII6-5d	Fw_GACTGCTAATTTCTTGATTGCTT Rv_TCTCTCAATTATGGCAGCTAATA	23(23)	56.96(56.05)	90	4
8	COSII 8-6e	Fw_GACGTGTTTTCTCATCTTGACA Rv_GGCATAGGCAGAGTGACATAC	22(21)	57.85(57.31)	130	1
9	COSII 9-4d	Fw_TTCATGCCCAGATGCAGCAG Rv_ACATCTCCTCCTTTTCTCCG	20(20)	59(58.32)	132	3

I marcatori *S. commersonii*-specifici sono stati utilizzati nella tecnologia HRM per individuare la similitudine presente tra i parentali e gli ibridi triploidi e aneuploidi. Le curve di *melting* ottenute in questa analisi hanno consentito di identificare le differenze e le similitudini genetiche presenti tra le specie. Dal paragone delle curve HRM degli ibridi con le miscele di DNA ottenute in laboratorio (vedi paragrafo 4.2.6) è stato possibile attribuire l'identità genetica degli ibridi per ognuno degli otto cromosomi analizzati. In figura 4.7 è riportato un risultato di analisi HRM ottenuta sul cromosoma 2. In tale immagine sono facilmente distinguibili le curve delle specie *S. tuberosum* in verde e *S. commersonii* in rosso. Le curve della miscela di DNA ottenuta tra *S. commersonii* e *S. tuberosum* nel rapporto 2:1 (C:T 2:1) e dell'ibrido triploide MCA1 sono invece sovrapposte, evidenziando quindi un'identità di sequenza molto elevata tra i due campioni.

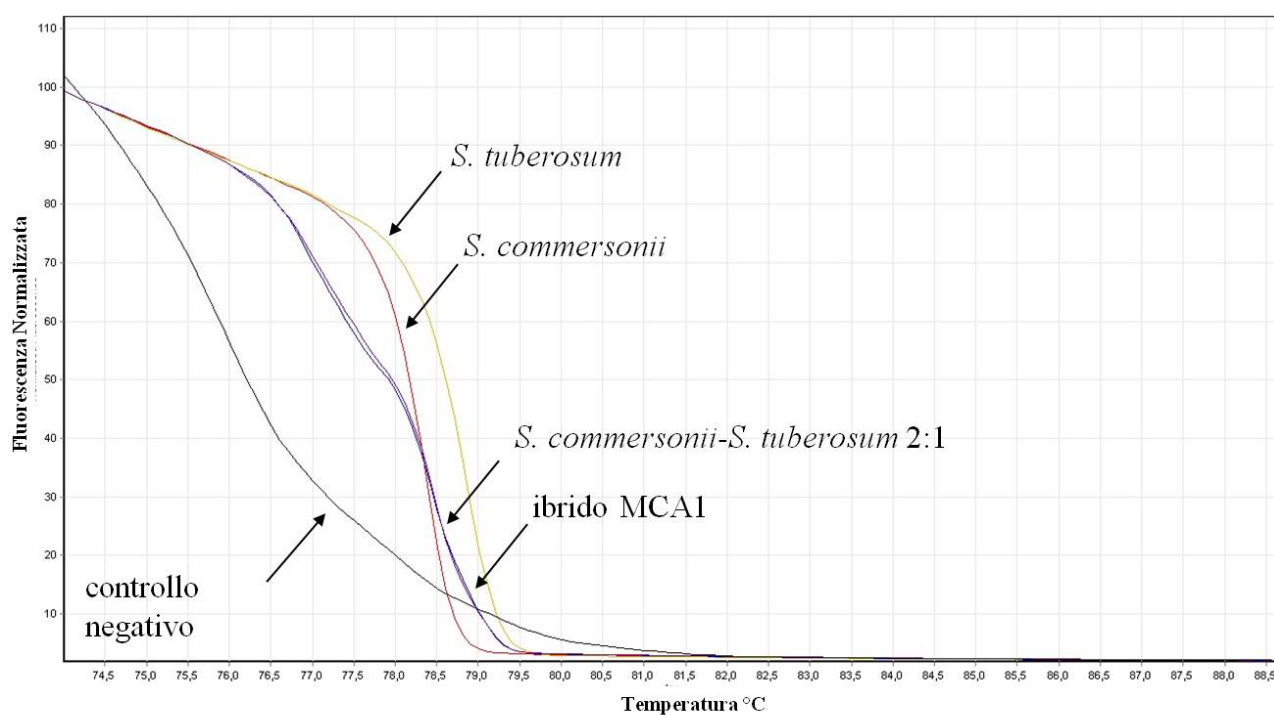


Figura 4.7: Curva di analisi HRM sul cromosoma 2 di *S. tuberosum*, *S. commersonii*, miscela di DNA C:T 2:1 e un ibrido triploide MCA1.

Tale identità di sequenza è stata ulteriormente evidenziata nella successiva grafica ottenuta nel saggio HRM. Infatti, in figura 4.8 sono stati riportati gli stessi genotipi presenti nella figura precedente. Anche in questo caso i picchi relativi all'ibrido triploide MCA1 e alla miscela di DNA C:T 2:1 presentano un'elevata similarità, essendo quasi sovrapposti e avendo la stessa temperatura di denaturazione. Il principio fondamentale su cui si basa la tecnologia HRM

è che gli individui con la stessa temperatura di *melting* hanno anche la stessa composizione genotipica.

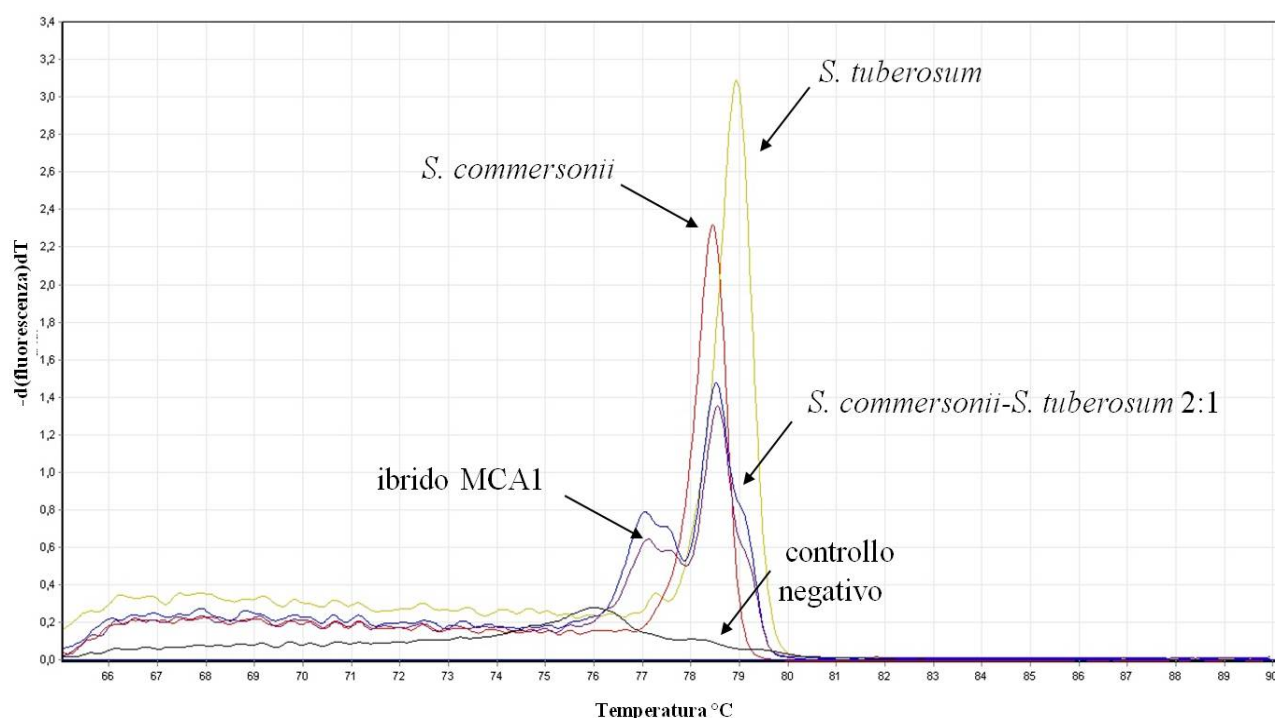


Figura 4.8: Picchi di *melting* HRM sul cromosoma 2 di *S. tuberosum*, *S. commersonii*, dell'ibrido triploide MCA1 e della miscela di DNA *S. commersonii* : *S. tuberosum* 2:1.














































































































L'analisi dei dati di identità percentuale, fornita dal software HRM, ha inoltre evidenziato che l'ibrido triploide MCA1 sul cromosoma 2 ha presentato una percentuale di identità del 98% con la miscela 2:1 tra il DNA di *S. commersonii* e *S. tuberosum*. Tale risultato era atteso considerando che gli ibridi triploidi derivano da incroci 4x x 2x tra *S. commersonii* 4x e *S. tuberosum* - *S. phureja* 2x. Analogo risultato è stato ottenuto per gli altri ibridi triploidi sugli altri cromosomi (Tabella 4.6). Tutti gli ibridi triploidi hanno presentato percentuali di identità superiori al 90% con la miscela di DNA C:T 2:1 o C:P 2:1. Solo in tre casi le percentuali di identità sono state inferiori a questo valore, ma comunque alte, indicando quindi il dosaggio cromosomico corrispondente al rapporto atteso *S. commersonii*:*S. tuberosum* 2:1. Tali dati hanno rappresentato una prova della validità della metodologia messa a punto e dell'applicabilità sugli altri ibridi disponibili per il dosaggio cromosomico. In tabella 4.6 per il cromosoma di ciascun ibrido triploide e aneuploide è riportato il dosaggio cromosomico C:T o C:P atteso in base alla percentuale di identità con il valore più elevato. Ad esempio, nell'ibrido aneuploide MCF1 (2n=33) per il cromosoma 2 era attesa una copia da *S. commersonii* e due

copie da *S. tuberosum*, perché il rapporto C:T 1:2 è quello che ha dato la percentuale di identità più elevata. Osservando la tabella 4.6 inoltre, è stato subito evidente come per gli ibridi aneuploidi, per i quali è attesa una minore quantità di cromosomi di *S. commersonii* rispetto alle altre specie parentali utilizzate nell'incrocio, vi sia la presenza di rapporti cromosomici differenti per ogni cromosoma. Al fine di rendere i dati ottenuti di più semplice interpretazione, nella tabella 4.7 è stata riportata una rappresentazione grafica riassuntiva della situazione cromosomica degli ibridi aneuploidi. L'ibrido MCL4 ($2n=33$), ad esempio, per il cromosoma 3 presenta una copia proveniente da *S. commersonii* e due copie da *S. tuberosum* mentre per il cromosoma 4 presenta un rapporto cromosomico inverso, ovvero due copie di *S. commersonii* e una di *S. tuberosum*.

Tabella 4.6 Risultati delle analisi HRM effettuate su otto cromosomi degli ibridi triploidi e ibridi aneuploidi. Per ogni ibrido sono riportati il corredo cromosomico somatico, l'origine e per ogni cromosoma il dosaggio cromosomico (C= *S. commersonii*; T= *S. tuberosum*; P= *S. phureja*) e le percentuali di identità (ID %). Il simbolo / indica l'assenza del dato.

IBRIDI TRIPLOIDI 4x x 2x	Corredo cromosomico	Cromosoma 1		Cromosoma 2		Cromosoma 3		Cromosoma 4		Cromosoma 5		Cromosoma 6		Cromosoma 8		Cromosoma 9	
		Dosaggio cromosomico	ID %	Dosaggio cromosomico	ID %	Dosaggio cromosomico	ID %	Dosaggio cromosomico	ID %	Dosaggio cromosomico	ID %	Dosaggio cromosomico	ID %	Dosaggio cromosomico	ID %	Dosaggio cromosomico	ID %
MCA1	2n=36	C:T 2:1	91,28	C:T 2:1	98,00	C:T 2:1	99,78	C:T 2:1	91,42	C:T 2:1	42,35	/		C:T 2:1	92,48	C:T 2:1	97,73
MCB1	2n=36	C:T 2:1	96,58	/		/		C:T 2:1	72,53	C:T 2:1	97,49	/		C:P 2:1	90,40	C:T 2:1	91,46
MCB3	2n=36	C:T 2:1	95,85	C:T 2:1	91,75	C:T 2:1	95,09	C:T 2:1	94,02	C:P 2:1	99,48	/		C:P 2:1	92,60	C:T 2:1	90,77
MCB10	2n=36	/		/		C:T 2:1	97,72	C:T 2:1	95,47	C:P 2:1	95,74	/		C:T 2:1	96,76	C:P 2:1	98,81
MCC1	2n=36	C:T 2:1	97,95	C:T 2:1	96,39	C:T 2:1	62,99	C:T 2:1	90,48	C:T 2:1	96,28	/		C:T 2:1	95,63	C:P 2:1	96,61
IBRIDI ANEUPLOIDI 3x x 2x																	
MCF1	2n=33	C:T:P1:1:1	96,68	C:T 1:2	96,47	C:T:P1:1:1	96,71	/		C:P 1:1	96,28	/		C:T 1:2	91,30	C:P 1:2	99,17
MCL4	2n=33	C:P 1:2	96,58	/		C:T 1:2	96,65	C:T 2:1	92,66	C:P 1:1	92,07	C:P 1:2	95,60	T:P 1:1	96,04	C:P 1:1	97,57
MCM1	2n=33	/		/		/		/		/		C:P 1:2	95,61	C:P 2:1	91,12	C:P 2:1	97,59
MCM4	2n=33	T:P 1:1	98,67	C:T 1:1	98,23	C:T 1:2	98,86	/		C:T 1:2	93,99	C:T:P1:1:1	96,62	C:P 1:1	99,47	C:T 1:2	97,19
MCM5	2n=31	C:T 1:2	93,44	C:T 2:1	96,43	C:T 1:2	98,38	C:T 1:1	92,72	C:T 1:2	97,77	C:P 1:2	91,92	C:P 1:1	91,17	C:P 1:1	97,61
MCM8	2n=33	C:P 1:2	94,62	C:P 2:1	95,02	C:T:P 1:1:1	90,65	C:T:P 1:1:1	90,4	C:P 2:1	97,93	C:P 1:2	93,64	C:P 1:1	90,02	C:P 1:1	99,40
MCN1	2n=33	C:T 1:2	92,97	C:T 1:1	98,3	C:T:P 1:1:1	91,7	C:T 1:2	91,5	C:T 1:2	99,75	C:P 1:2	91,21	C:P 1:1	94,77	C:P 1:2	93,74
MCN2	2n=33	C:P 1:2	90,14	C:T:P 1:1:1	91,18	C:P 1:2	95,74	C:P 1:1	97,7	C:P 1:1	95,55	C:T 2:1	93,24	C:T 1:2	97,94	C:T:P 1:1:1	91,42
MCN3	2n=33	C:P 1:1	95,39	C:T 2:1	91,88	C:T:P 1:1:1	93,41	C:T 1:1	91,89	C:T 2:1	92,48	C:P 2:1	95,43	C:P 1:1	93,55	C:T 2:1	99,3
MCH1	2n=33	C:P 1:1	94,10	C:T:P 1:1:1	90,86	C:P 1:1	90,69	C:P 1:2	93,18	C:T 1:2	97,99	/		C:P 2:1	90,68	C:T 1:1	96,52
MCH2	2n=33	C:P 1:1	94,1	C:T 1:2	90,36	C:T:P 1:1:1	98,95	C:T:P 1:1:1	91,27	/		/		C:P 1:2	96,62	C:T 2:1	96,22
MCH5	2n=33	/		C:T 2:1	94,04	C:P 1:1	93,11	C:T:P 1:1:1	93,01	C:T 1:2	96,12	/		C:P 2:1	97,06	C:P 2:1	96,14
MCH11	2n=33	C:T 1:2	93,72	C:T 2:1	96,08	C:T:P 1:1:1	90,55	C:T:P 1:1:1	92,11	C:T:P 1:1:1	96,49	/		C:P 1:1	91,04	C:P 1:2	98,26
MCQ1	2n=32	C:T:P 1:1:1	92,23	C:T:P 1:1:1	92,91	C:T 1:2	98,02	C:T:P 1:1:1	91,21	C:T 1:2	90,13	/		C:P 1:1	94,94	T:P 1:1	95,33
MCQ2	2n=33	C:T:P 1:1:1	98,24	C:T 1:2	95,24	C:T 1:2	96,89	C:T 1:2	95,16	C:T 1:2	96,21	/		C:P 1:1	94,07	C:T 1:2	99,65
MCY3	2n=33	C:T 1:2	94,75	C:P 1:2	90,41	C:T 1:2	96,34	C:T:P 1:1:1	97,13	C:P 1:1	97,39	/		C:P 1:2	99,64	C:T 2:1	97,65

Tabella 4.7 Rappresentazione grafica del dosaggio cromosomico ottenuto sugli 8 cromosomi analizzati per i 16 ibridi triploidi aneuploidi. I cromosomi di colore verde rappresentano i cromosomi appartenenti alla specie selvatica *S. commersonii*, quelli azzurri a *S. tuberosum* e *S. phureja*.

Ibridi aneuploidi	Cromosoma							
	1	2	3	4	5	6	8	9
MCF1 2n=33				/		/		
MCL4 2n=33		/						
MCM1 2n=33	/	/	/	/	/			
MCM4 2n=33								
MCM5 2n=31				/				
MCM8 2n=33								
MCN1 2n=33								
MCN2 2n=33								
MCN3 2n=33						/		
MCH1 2n=33						/		
MCH2 2n=33					/	/		
MCH5 2n=33	/					/		
MCH11 2n=33						/		
MCQ1 2n=32						/		
MCQ2 2n=33						/		
MCY3 2n=33						/		

4.4 Discussione

Tra le specie selvatiche diploidi ($2n=2x=24$) di patata, *S. commersonii* riporta numerosi caratteri d'interesse per il miglioramento genetico; tra cui resistenze a stress biotici e abiotici, elevato contenuto in sostanza secca dei tuberi; tuttavia è sessualmente isolata dalla patata coltivata tetraploide ($2n=4x=48$) a causa di barriere sessuali post-zigotiche (Camadro et al., 2004). Per il superamento di tali difficoltà Carputo et al. (1997), hanno proposto uno schema di incroci basato sulle ploidie ponte, come una valida strategia per l'introggressione di geni d'interesse, non solo da *S. commersonii* ma anche delle altre specie della serie Stellata alla patata coltivata. Lo schema delle ploidie ponte si basa sulla manipolazione *in vitro* della ploidia di *S. commersonii* e sulla produzione di ibridi ponte triploidi, pentaploidi e aneuploidi. Gli ibridi aneuploidi derivanti da incroci $3x \times 2x$ hanno rappresentato il punto di partenza dell'attività di ricerca descritta in questo capitolo.

Ibridi con corredo cromosomico altamente variabile (euploide o aneuploide) possono essere ottenuti in varie specie, con numerose strategie di ibridazione e manipolazione citogenetica. Ne sono un esempio le linee di sostituzione in cui cromosomi omologhi di una specie coltivata vengono sostituiti con quelli di una specie tassonomicamente affine che contiene caratteri d'interesse (Tek et al., 2004; Hu et al., 2011; Lei et al., 2011) legati alla resistenza. In frumento ad esempio, lo sviluppo di linee di sostituzione è stato utile per il trasferimento della resistenza a *Puccinia striiformis* sp. *tritici*, una delle patologie fungine più devastanti al mondo (Hu et al., 2011; Lei et al., 2011). In patata, lo sviluppo di una linea di sostituzione contenente il cromosoma 8 della specie selvatica *S. brevidens* suggerisce il trasferimento di resistenze al marciume molle del tubero e alla peronospora, data la presenza in questa specie di resistenza nei confronti di entrambe le patologie (Tek et al., 2004). Un ulteriore esempio è rappresentato dalle linee di addizione, in cui oltre al corredo cromosomico della specie da migliorare sono presenti un cromosoma (addizione monosomia) o una coppia di cromosomi omologhi (addizione disomica) derivante da una specie citogeneticamente affine (Tang et al., 2001; Jauhar et al. 2009). La caratterizzazione di tali materiali è spesso effettuata mediante elaborate e lunghe tecniche citogenetiche di ibridazione (FISH, GISH e Giemsa C-banding), accompagnate da analisi con marcatori molecolari basati sulla PCR (Hu et al., 2011; Lei et al., 2011).

Data la frequenza con cui tali materiali sono prodotti, è sempre più sentita l'esigenza di mettere a punto una strategia per il dosaggio cromosomico che sia più semplice, rapida e innovativa di quelle attuali basate sui metodi citologici. E' in questa prospettiva che è stata affrontata la ricerca qui descritta, basata sulla specificità dei marcatori COSII e sulla precisione della tecnica HRM.

I marcatori molecolari COSII, utilizzati in questo studio, rappresentano geni conservati in singola copia e cromosoma specifici, presenti nella famiglia delle *Solanaceae* e delle *Rubiaceae* (Wu et al., 2006). Essi sono marcatori di semplice utilizzo, perché basati essenzialmente sulla PCR, ma la caratteristica che li contraddistingue e che rappresenta la più interessante per la presente attività di ricerca, è che sono cromosoma specifici e in singola copia. Tramite essi, quindi, è possibile individuare tutti i cromosomi, in quanto ogni cromosoma è identificato da un marcatore. In questo studio, la selezione di diversi marcatori ci ha permesso di amplificare zone che distinguono un cromosoma dall'altro. In esse sono stati individuati polimorfismi specifici per *S. commersonii* che hanno portato alla costruzione di marcatori capaci di identificare, in maniera precisa e univoca, i diversi cromosomi di questa specie all'interno degli ibridi disponibili. Ad oggi in letteratura non sono riportati usi analoghi dei COSII per le specie selvatiche di patata. Sono riportate, ovviamente, numerose altre applicazioni. Ad esempio, Fulton et al. (2002) hanno utilizzato i marcatori COSII in studi evoluzionistici in *Arabidopsis*, sottolineando il loro utilizzo in analisi di mappaggio comparativo tra diverse famiglie vegetali e nello sviluppo di *network* sintenici tra taxa vegetali. Più recentemente, Wu et al. (2009), attraverso il mappaggio di 110 marcatori COSII, hanno sviluppato una dettagliata mappa sintenica tra il genoma di pomodoro e melanzana, contribuendo in tal modo al progresso degli studi evoluzionistici nella famiglia delle *Solanaceae*.

La strategia messa a punto in questa attività di ricerca ha previsto due fasi. La prima ha permesso, mediante i marcatori molecolari COSII e il sequenziamento degli amplificati, l'identificazione dei siti polimorfici necessari per il disegno dei *primer* *S. commersonii* specifici. Questi, nella seconda fase, sono stati utilizzati per il dosaggio cromosomico degli ibridi attraverso l'HRM.

L'HRM consente di superare le limitazioni dei marcatori molecolari basati sull'elettroforesi ed è diventata sempre più promettente in studi per l'identificazione di SNPs, nonché nei programmi di miglioramento genetico della patata coltivata. Di solito ampliconi differenti provenienti da alleli di un gene noto, se differiscono di uno o pochi nucleotidi, non possono essere studiati con una RT-PCR convenzionale; l'HRM risolve ampiamente questo problema divenendo utile anche in studi di mappaggio QTL (Yuan et al., 2008). Un limite di tale

tecnologia è rappresentato, però, dalla lunghezza degli ampliconi che se supera le 300 basi non consente allo strumento di definire con accuratezza i polimorfismi; questi ultimi, inoltre, non possono essere identificati neanche se sono localizzati molto vicino ai *primer* (Hofinger et al., 2009).

Dalla sua invenzione, nel 2003, l'HRM è stata ampiamente utilizzata in studi di chimica clinica e patologia umana, per la diagnosi molecolare di malattie e per la genotipizzazione di pazienti (Reed et al., 2007). Fino a qualche anno fa in letteratura non erano stati riportati usi di HRM nel campo vegetale. Dal 2008 alcuni gruppi di ricerca, quasi in contemporanea, hanno riportato applicazioni dell'HRM per il mappaggio dei polimorfismi SNPs o microsatelliti (Mader et al., 2008) in varie specie vegetali tra cui melo (Chagne et al., 2008), orzo (Lehmensiek et al., 2008), mandorlo (Wu et al., 2008), vite e olivo (Mackay et al., 2008). L'HRM è stata ampiamente utilizzata anche per identificare e quantificare l'RNA editing in *Arabidopsis* (Chateigner-Boutin e Small, 2007), per identificare nuovi alleli in geni d'interesse in orzo (Hofinger et al., 2009), o per la certificazione varietale (Mackay et al., 2008). L'utilizzo dell'HRM è stato esteso anche a studi di metilazione del DNA (Wojdacz e Dobrovic, 2007) e alla determinazione del dosaggio genico mediante il paragone delle curve di *melting* di alleli noti a quelle di alleli sconosciuti (Vossen et al., 2009). In patata l'HRM è stata usata da Yuan et al. (2008) per lo studio delle varianti alleliche e da De Koeijer et al. (2010) per studi di *genotyping* e di polimorfismo nella patata diploide e tetraploide.

Ad oggi, però, l'HRM non è stata mai utilizzata per studi di dosaggio cromosomico accoppiato alla potenzialità di marcatori molecolari specie-specifici. Questo studio rappresenta, perciò, il primo caso in cui l'HRM viene applicata al dosaggio dei cromosomi. In letteratura per il dosaggio cromosomico sono riportati altre strategie che prevedono analisi citologiche quali “*Genomic in situ hybridization*” (GISH), “*Fluorescence in situ hybridization*” (FISH) e Giemsa C-banding (Hu et al., 2011; Lei et al., 2011). La GISH è da sempre una delle più popolari per l'identificazione dell'origine di cromatina “estranea” introgressa nelle specie sottoposte a miglioramento genetico. La FISH aiuta particolarmente nell'identificazione di singoli cromosomi (Dong et al., 2001) e nel mappaggio di centromero, eterocromatina e altre regioni cromosomiche specifiche (Gavrilenko, 2011). Il Giemsa C-banding è, infine, un metodo usato per la corretta localizzazione di strutture cromosomiche non identificabili con la FISH (Zhang et al., 2009). Studi GISH e FISH hanno fornito informazioni utili nel differenziare genomi anche strettamente relazionati in poliploidi naturali o artificiali e sui putativi progenitori (Gavrilenko, 2011). L'uso sequenziale della GISH e FISH, sullo stesso preparato cromosomico e in un unico esperimento, è stato proposto da Dong et al., (2001) per comprendere l'origine genomica e

l'identità genetica dei cromosomi estranei in linee di patata ottenute mediante miglioramento genetico. Esempi dell'uso delle tecniche GISH e FISH sono riportati nelle graminacee da Kosmala et al. (2006) per seguire la presenza di frammenti cromosomici portatori di putativi geni di resistenza, introgressi da *Festuca pratensis* a *Lolium multiflorum*. Un ulteriore esempio di impiego di GISH, FISH e C-banding è riportato per l'identificazione della presenza o assenza di cromosomi provenienti dai parentali in linee di sostituzione di frumento (Lei et al., 2011). Anche Piperidis et al. (2010) riportano l'uso della GISH per determinare la presenza di cromosomi derivati dalla specie selvatica, nel genoma di cultivar della canna da zucchero.

Il monitoraggio dei dosaggi cromosomici a seguito di ibridazioni interspecifica non è sempre semplice. Esso è però importante per una maggiore comprensione delle performance agronomiche ottenute (Dong et al., 2001). Determinare la natura degli extra-cromosomi introdotti è utile in molte fasi. Consente, ad esempio, di selezionare le varianti cromosomiche (come monosomie), di valutare la presenza di una trasmissione preferenziale di cromosomi durante gli incroci inter-ploidia, di produrre linee di addizione monosomica e disomica, di identificare le determinanti genetiche responsabili del controllo di caratteri d'interesse e di assegnare geni o gruppi di associazione ai rispettivi cromosomi. Nel caso della patata e delle strategie basate sulla produzione di ploidie ponte triploidi, l'identificazione della distribuzione dei cromosomi in ibridi aneuploidi risulta particolarmente importante in quanto, da incroci $3x-2x$ e $4x-5x$, sono attese progenie con corredi cromosomici variabili da 24 a 36 in un caso e da 48 a 60 nell'altro.

La strategia messa a punto si è dimostrata molto efficiente per la rapida attribuzione dell'identità genetica degli ibridi disponibili. L'efficienza e l'attendibilità dei risultati ottenuti è dimostrata da quanto riscontrato negli ibridi triploidi (provenienti da incroci $4x - 2x$), che hanno tutti confermato i valori di dosaggio cromosomico attesi. Infatti, i cromosomi analizzati, hanno sempre presentato due copie cromosomiche ereditate dalla specie selvatica *S. commersonii* e una copia ereditata da *S. tuberosum*. Le analisi effettuate sugli ibridi ipotriploidi aneuploidi (provenienti da incroci $3x - 2x$) hanno consentito di determinare il dosaggio cromosomico di ogni ibrido disponibile, rivelando un quantitativo inferiore di cromosomi di *S. commersonii* rispetto a *S. tuberosum*. Questo risultato è in accordo a quanto riscontrato da Iorizzo et al. (2011). Gli autori mediante l'utilizzo dei marcatori AFLP, hanno mostrato che gli ibridi ipotriploidi aneuploidi presentano elevata variabilità in termini di numero cromosomico (da 26 a 36) e che gli ibridi triploidi sono più simili a *S. commersonii* rispetto a *S. tuberosum* o *S. phureja*. Non è stato possibile definire il numero totale del corredo cromosomico degli ibridi triploidi e aneuploidi data l'assenza di dati informativi sui 4 cromosomi rimanenti. La selezione di ulteriori

marcatori COSII sui cromosomi rimanenti e lo sviluppo di marcatori *S. commersonii* specifici da usare nell'HRM saranno necessari per completare i dati di dosaggio genomico.

Lo studio effettuato sarà utile non solo per studi di genetica di base, ma anche per la rapida selezione degli ibridi che contengono i geni d'interesse provenienti da una specie selvatica, geni di cui si conosce la localizzazione cromosomica.

In conclusione, la combinazione dei COSII con l'HRM ha permesso di mettere a punto una nuova strategia di analisi utile per determinare il dosaggio cromosomico di ibridi interspecifici aneuploidi *S. tuberosum*-*S. commersonii* già caratterizzati dal punto di vista fenotipico (Iorizzo et al., 2011). L'approccio usato in questo studio ha confermato il potere dell'HRM nell'analizzare rapidamente e con semplicità le variazioni genetiche tra campioni differenti ed estende le applicazioni della tecnologia all'individuazione di marcatori cromosoma-specifici per definire il dosaggio cromosomico degli ibridi. La metodologia messa a punto può agevolmente essere applicata anche in altre specie agrarie, diploidi e poliploidi, contribuendo alle analisi genetiche e al miglioramento delle stesse.

Capitolo 5

5.1 Conclusioni

La patata è la quarta tra le colture più importanti nel mondo dopo il frumento, il mais e il riso. La sua produzione annuale è stimata a circa 300 milioni di tonnellate. E' una specie tetraploide ($2n=4x=48$), propagata attraverso cloni ed ha una base genetica molto ristretta; pertanto è vulnerabile all'attacco di numerosi patogeni (Gebhardt e Valkonen, 2001).

Tra le specie selvatiche di patata è disponibile una elevata variabilità genetica; è stato calcolato che solo il 10% di questa specie è stato utilizzato in studi ed indagini utili ai fini del miglioramento genetico di *S. tuberosum* (Gavrilenko, 2011). Vi è, quindi, un ampio divario tra l'elevata biodiversità disponibile nell'ambito delle specie selvatiche di patata e il loro effettivo utilizzo nel risolvere problematiche associate alla resistenza a stress o alla produttività (Pavek e Corsini, 2001). Molte specie selvatiche particolarmente resistenti a patogeni o a stress abiotici, inoltre, sono sessualmente isolate dalla patata coltivata tetraploide. Pertanto, vi sono numerose difficoltà nella loro inclusione in programmi di miglioramento genetico classico, che spesso richiedono tempi lunghi e metodiche laboriose per l'ottenimento di ibridi e per la selezione dei materiali. Taluni geni di interesse presenti nelle moderne varietà di patata sono stati introgressi da specie strettamente correlate ad essa, comportando così un ulteriore restringimento della base genetica delle moderne varietà (Gavrilenko, 2011).

Per ampliare tale base genetica e per trasferire i geni d'interesse provenienti dalle specie selvatiche di *Solanum* nell'ambito della comunità scientifica è sempre più sentita l'esigenza di sviluppare nuovi strumenti basati sulla genomica strutturale e funzionale, che consentano una più efficiente valorizzazione dell'ampio patrimonio genetico presente nell'ambito del genere *Solanum* e, di conseguenza, di potenziare le attuali strategie di miglioramento genetico.

Il lavoro sperimentale effettuato in questo dottorato si inserisce in programmi di ricerca svolti presso il DiSSPAPA finalizzati alla salvaguardia, alla valorizzazione, allo studio e alla utilizzazione di germoplasma selvatico di patata, in particolare per lo sviluppo di nuovi strumenti genomici applicabili al miglioramento genetico della patata.

Il lavoro svolto si è incentrato sulla disponibilità di materiale vegetale costituito da specie selvatiche, varietà coltivate e ibridi interspecifici di patata. Le prime due sono state

utilizzate in analisi finalizzate all'identificazione di caratteri di resistenza a stress biotici nonché allo sviluppo di strumenti genomici da utilizzare in schemi di miglioramento genetico; gli ibridi interspecifici, invece, sono stati utilizzati per lo sviluppo di una strategia di valutazione del dosaggio cromosomico.

L'attività svolta è stata articolata in tre parti. La prima è stata finalizzata all'identificazione di nuove fonti di resistenza a patogeni e di alleli SSR specie-specifici. La seconda all'analisi bioinformatica di marcatori DArT e l'ultima alla messa a punto di una strategia per la determinazione del dosaggio cromosomico in materiale vegetale.

Per quanto riguarda la prima attività, nelle specie selvatiche *S. bulbocastanum*, *S. etuberosum* e *S. chacoense* sono stati individuati cloni con resistenze multiple nei confronti del fitopatogeno vascolare *R. solanacearum* e del virus Y della patata. Resistenze specifiche nei confronti dei singoli patogeni sono state individuate, inoltre, in cloni delle specie *S. bulbocastanum*, *S. cardiophyllum*, e *S. phureja*. Tali risultati ampliano le conoscenze sui caratteri utili presenti nell'ambito del germoplasma selvatico di patata e si rivelano necessari nelle prime fasi di miglioramento genetico, per la selezione dei materiali recanti i caratteri d'interesse da introdurre nella patata coltivata. Nell'attività di ricerca che ha coinvolto le specie selvatiche, inoltre, è stata effettuata un'accurata genotipizzazione molecolare di 21 cloni di 12 specie, già caratterizzate per la resistenza, e di 24 varietà coltivate. L'analisi dei profili SSR ha consentito di identificare numerosi alleli specie-specifici per tutte le specie selvatiche ed assenti in tutte o in specifiche varietà coltivate. Tali alleli possono essere considerati strumenti genomici di grande utilità nel miglioramento genetico, in quanto utilizzabili in programmi di selezione assistita negativa.

Relativamente all'analisi bioinformatica delle mappe di associazione genetica DArT delle specie selvatiche *S. commersonii* e *S. bulbocastanum*, questa ha consentito di determinare l'elevata qualità e affidabilità dei marcatori DArT, risultati altamente specifici in quanto ritrovati, per la quasi totalità della loro lunghezza, su regioni non ridondanti dei genomi di patata e pomodoro contro cui sono stati allineati. Sono stati poi identificati ben 150 marcatori specifici per le specie selvatiche ed assenti nelle varietà coltivate di patata e pomodoro; 23 marcatori DArT sono risultati associati a geni di resistenza quali il gene *Mi* di resistenza a nematodi, il gene *Rpi-blb* di resistenza a peronospora e i geni *Cf-4* e *Cf-9* di resistenza a *Cladosporium fulvum*. La presenza di un marcatore specifico di una regione e, al tempo stesso, associato a un gene d'interesse è fondamentale perché può dare la possibilità di agire in maniera mirata su quello specifico gene e di utilizzare tale marcatore nei programmi di selezione assistita positiva e negativa. Inoltre, l'analisi bioinformatica condotta ha permesso di effettuare studi di sintenia

tra i genomi di patata e pomodoro e quelli delle specie selvatiche *S. commersonii* e *S. bulbocastanum* mediante i marcatori DArT. Quest'ultima analisi ha consentito di confermare l'annotazione funzionale dei marcatori e, per *S. bulbocastanum*, di validare la sequenzialità dei marcatori nella mappa genetica rispetto ai genomi analizzati. La coerenza dell'annotazione funzionale tra i due genomi rispetto ai marcatori DArT rappresenta un dato importante per fornire informazioni sull'associazione di tali marcatori a geni d'interesse e sulla conservazione della localizzazione di tali geni tra le specie selvatiche e quelle coltivate.

Il lavoro svolto in questa tesi ha, infine, previsto la messa a punto una nuova strategia che, combinando la semplicità della tecnica HRM con la precisione dei marcatori SNPs *S. commersonii*-specifici, ha consentito per la prima volta il dosaggio genomico della specie selvatica *S. commersonii* in ibridi tra *S. commersonii* e *S. tuberosum*. La strategia sviluppata ha consentito la caratterizzazione contemporanea di più ibridi in tempi molto rapidi e in un unico esperimento; l'unico passaggio limitante in termini di tempo impiegato è stato rappresentato dalla fase di individuazione dei marcatori *S. commersonii* specifici. Le vantaggiose caratteristiche di praticità d'uso, rapidità e basso costo dell'HRM rendono questa tecnologia attraente per numerose applicazioni, non solo nell'ambito della patata ma anche di altre specie vegetali. Tale strategia, infatti, può essere estesa alla valutazione della trasmissione preferenziale di cromosomi durante gli incroci o all'individuazione di monosomie per un determinato cromosoma sia in ambito vegetale che animale.

Nel complesso gli strumenti genomici sviluppati apportano un ulteriore contributo per l'utilizzazione dell'ampia biodiversità presente nell'ambito delle specie selvatiche di *S. tuberosum* e sono strumenti fruibili dall'intera comunità scientifica per il miglioramento genetico di altre specie ad interesse agrario.

Bibliografia

- Agarwal M., Shrivastava N. and Padh H. (2008): Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports*; 27:617-631.
- AGI (Arabidopsis Genome Initiative) (2000): Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*; 408:796-815.
- Amorin E.P., Vilarinhos A.D., Cohen K.O., Amorim V.B.O., dos Santos-Serejo J.A., S. Oliveira e Silva, Pestana K.N., dos Santos V.J., Paes N.S., Monte D.C. and dos Reis R.V. (2009): Genetic diversity of carotenoid-rich bananas evaluated by diversity arrays technology (DArT). *Genetics and Molecular Biology*; 32:96-103.
- Aranzana M., Carbó J. and Arús P. (2003): Microsatellite variability in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]: cultivar identification, marker mutation, pedigree inferences and population structure. *Theoretical and Applied Genetics*; 106:1341-1352.
- Ashkenazi V., Chani E., Lavi U., Levy D., Hillel J., Veilleux R.E. (2001): Development of microsatellites markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analysis. *Genome*; 44:50-62.
- Aversano R., Ercolano M.R., Frusciante L., Monti L., Bradeen J.M., Cristinzio G., Zoina A., Greco N., Vitale S., Carputo D. (2007): Resistance traits and AFLP characterization of diploid primitive tuber-bearing potatoes. *Genetic Resources Crop Evolution*; 54:1797-1806.
- Badea A., Eudes F., Graf R.J., Laroche A., Gaudet D.A., Sadasivaiah R.S. (2008): Phenotypic and marker-assisted evaluation of spring and winter wheat germplasm for resistance to fusarium head blight. *Euphytica* 164:803-819.
- Bai G., Guo P., Kolb F.L. (2003): Genetic relationships among head blight resistant cultivars of wheat assessed on the basis of molecular markers. *Crop Science*; 43:498-507.
- Ballvora A., Ercolano M.R., Wei J., Meksem K., Bormann C.A., Oberhagemann P., Salamini F., Gebhardt C. (2002): The *R1* gene for potato resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) belongs to the leucine zipper/NBS/LRR class of plant resistance genes. *Plant Journal*; 30:361-371.
- Barone A. (2004): Molecular marker-assisted selection for potato breeding. *American Journal of Potato Research*; 81:111-117.
- Barone A., Chiusano M.L., Ercolano M.R., Giuliano G., Grandillo S., and Frusciante L. (2008): Structural and functional genomics of tomato. *International Journal of Plant Genomics*; ID 820274:1-12.
- Birchler J.A. Yao H., Chudalayandi S., Vaiman D., and Veitac R.A. (2010): Heterosis. *Plant Cell*; 22: 2105-2112.

- Blanc G. and Wolfe K. H. (2004): Widespread paleopolyploidy in model plant species inferred from age distributions of duplicate genes. *Plant Cell*; 16:1667-1678.
- Blanco-Urgoiti B., Tribodet M., Leclere S., Ponz F., Pérez de san román C., Legorburu F.J. and Kerlan C. (1998): Characterization of potato potyvirus Y (PVY) isolates from seed potato batches. Situation of the NTN, Wilga and Z isolates. *European Journal of Plant Pathology*; 104:811-819.
- Bolibok-Bragoszewska H., Heller-Uszynska K., Wemzel P., Uszynski G., Kilian A. and Rakoczy-Trojanowska M. (2009): DArT markers for the rye genome-genetic diversity and mapping. *BioMed Central Genomics*; 10:578.
- Bradshaw J. (2007): Potato-Breeding Strategies. In *Potato Biology and Biotechnology: advances and perspectives*. Edited by Vreugdenhil D., Bradshaw J., Gebhardt C., Govers F., MacKerron D., Taylor M. and Ross H. Elsevier, Oxford, UK. pp. 157-179.
- Bradshaw J.E., Bryan G.J. and Ramsay G. (2006): Genetic resources (including wild and cultivated *Solanum* species) and progress in their utilisation in potato breeding. *Potato Research*; 49:49-65.
- Bryan G.J. (2007): Genomics. In *Potato Biology and Biotechnology: advances and perspectives*. Edited by Vreugdenhil D., Bradshaw J., Gebhardt C., Govers F., MacKerron D.K.L., Taylor M.A., Ross H.A. Elsevier, Oxford, UK. pp. 179-202.
- Burlingame B., Mouillé B., Charrondiére U.R. (2009): Review: nutrients, bioactive non-nutrients and anti-nutrients in potatoes. *Journal of Food Composition and Analysis*; 22: 494-502.
- Camadro E., Carputo D., Peloquin S.J. (2004): Substitutes for genome differentiation in tuber-bearing *Solanum*: interspecific pollen-pistil incompatibility, nuclear cytoplasmic male sterility, and endosperm. *Theoretical and Applied Genetics*; 109:1369-1376.
- Cardi T., Iannamico V., D'Ambrosio F., Filippone E., Lurquin P.F. (1993): *In vitro* regeneration and cytological characterization of shoots from leaf explants of three accessions of *Solanum commersonii*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*; 34:107-114.
- Carputo D. (1999): Post-zygotic gametic selection due to endosperm balance number explains unusual chromosome numbers of 3x x 2x progeny in *Solanum*. *Sexual Plant Reproduction*; 12:27-31.
- Carputo D. and Barone A. (2005): Ploidy manipulation in potato through sexual hybridization. *Annals of Applied Biology*; 146:71-79.
- Carputo D. and Frusciante L. (2011): Classical genetics and traditional breeding. In *Genetics, Genomics and Breeding in Potato*. Edited by Bradeen J.M. and Kole C. Science Publishers, U.S.
- Carputo D., Aversano R., Barone A., Di Matteo A., Iorizzo M., Sigillo L., Zoina A., Frusciante L. (2009): Resistance to *Ralstonia solanacearum* of Sexual Hybrids Between *Solanum commersonii* and *S. tuberosum*. *American Journal on Potato Research*; 86:196-202.

- Carputo D., Barone A., Cardi T., Sebastiano A., Frusciante L. and Peloquin S.J. (1997): Endosperm Balance Number manipulation for direct germplasm introgression to potato from a sexually isolated relative (*Solanum commersonii* Dun.). Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America; 94:12013-2017.
- Carputo D., Cardi T., Frusciante L., Peloquin S.J. (1995): Male fertility and cytology of triploid hybrids between tetraploid *Solanum commersonii* ($2n=4\times=48$, 2EBN) and Phureja-Tuberosum haploid hybrids ($2n=2\times=24$, 2EBN). Euphytica; 83:123-129.
- Carputo D., Savarese S., Andolfi A., Aversano R., Cimmino A., Frusciante L., Evidente A. (2010): Glycoalkaloid profile in potato haploids derived from *Solanum tuberosum* - *S. bulbocastanum* somatic hybrids. Chemistry and Biodiversity; 7:1885-1892.
- Chagne D., Gasic K., Crowhurst R.N., Han Y., Bassett H.C., Bowatte D.R., Lawrence T.J., Rikkerink E.H.A., Gardiner S.E., Korban S.S. (2008): Development of a set of SNP markers present in expressed genes of the apple. Genomics; 92:353-358.
- Chateigner-Boutin A.L. and Small I. (2007): A rapid high-throughput method for the detection and quantification of RNA editing based on high-resolution melting of amplicons. Nucleic Acids Research; 35:e114.
- Chiusano M.L., D'Agostino N., Traini A., Di Filippo M., Frusciante L. (2009): *ISOL@*: una piattaforma bioinformatica per l'analisi strutturale e funzionale del genoma del pomodoro in Genomica per la valorizzazione di frumento duro e pomodoro. Georgofili Quaderni 2009-III ISBN 978-88-596-0760-1 Edizioni Polistampa Firenze Supplemento a «I Georgofili. Atti dell'Accademia dei Georgofili» Anno 2009 - Serie VIII - Vol. 6 p.173-186.
- Chung Y.S., Holmquist K., Spooner D.M., Jansky S.H. (2011): a test of taxonomic and biogeographic predictivity: resistance to soft rot in wild relatives of cultivated potato. Phytopathology; 101:205-212.
- Collard B.C., Mackill D.J. (2008): Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. Philosophical Transactions of the Royal Society Lond. B Biol Sci.; 363:557-72.
- De Koeber D., Douglass K., Murphy A., Whitney S., Nolan L., Song Y., De Jong W. (2010): Application of high-resolution DNA melting for genotyping and variant scanning of diploid and autotetraploid potato. Molecular Breeding; 25: 67-90.
- De Koeber, Chen H. and Gustafson V. (2011): Molecular breeding for potato improvement. In Genetics, genomics and breeding of potato. Bradeen J.M. and Kole C. editors, CRC Press New York.
- Deslandes L., Olivier J., Theulières F., Hirsch J., Feng D.X., Bittner-Eddy P., Beynon J. and Marco Y. (2002): Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive *RRS1-R* gene, a member of a novel family of resistance genes. Proceedings of the National Accademy of Sciences of the United States of America; 99:2404-2409.

- Dong F., McGrath M., Helgeson J.P. and Jiang J. (2001): The genetic identity of alien chromosomes in potato breeding lines revealed by sequential GISH and FISH analyses using chromosome-specific cytogenetic DNA markers. *Genome*; 44:729-734.
- Dougherty W.G. and Carrington J.C. (1988): expression and function of potyviral gene products annual review of phytopathology; 26:123-143.
- Edgerton M.D. (2009): Increasing crop productivity to meet global needs for feed, food, and fuel. *Plant Physiology*; 149:7-13.
- Elphinstone J.G., Hennessy J., Wilson J.K. and Stead E. (1996): Sensitivity of different methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. *Bulletin OEPP/EPPO*; 26:663-678.
- Enciso-Rodriguez F., (2010): Genetic variation in the *Solanaceae* fruit bearing species lulo and tree tomato revealed by Conserved Ortholog (COSII) markers. *Genetics and Molecular Biology*; 33:271-278.
- Faccioli P., Stanca A.M., Morcia C., Terzi V. (2009): From DNA sequence to plant phenotype: bioinformatics meets crop science. *Current Bioinformatics*; 4:173-176.
- Fegan M. and Prior P. (2005): How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex”? In *Bacterial Wilt: the disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex*. Edited by Allen C., Prior P. and Hayward C. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN pp. 449-462.
- Feingold S, Lloyd J., Norero N., Bonierbale M., Lorenzen J. (2005): Mapping and characterization of new EST-derived microsatellites for potato (*Solanum tuberosum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*; 111:456-466.
- Fenart S., Austerlitz F., Cuguen J., Arnaud J.F. (2007): Long distance pollen-mediated gene flow at a landscape level: the weed beet as a case study. *Molecular Ecology*; 16:3801-3813.
- Fulton T.M., Van der Hoeven R., Eannetta N.T., Tanksley S.D. (2002): Identification, analysis and utilization of conserved ortholog set markers for comparative genomics in higher plants. *Plant Cell*; 14:1457-1467.
- Galván M.Z., Lanteri A.A., Menéndez Sevillano M.C., Balatti P.A. (2010): Molecular characterisation of wild populations and landraces of common bean from northwestern Argentina. *Plant Biosystem*; 144: 365-372.
- Gavrilenko (2011): Application of molecular cytogenetics in fundamental and applied research of potato. In *Genetics, genomics and breeding of potato*. Edited by Bradeen J.M. and Kole C. CRC Press New York. pp. 184-206
- Gebhardt C, Ritter E., Barone A., Debener T., Walkemeier B., Schachtschabel U., Kaufmann H., Thompson R.D., Bonierbale M.W. and Ganai M.W. (1991): RFLP maps of potato and their alignment with the homoeologous tomato genome. *Theoretical and Applied Genetics*; 83:49-57.

- Gebhardt C. (2007): Molecular markers, maps and population genetics. In Potato Biology and Biotechnology: advances and perspectives. Edited by Vreudgenhil D., Bradshaw J., Gebhardt C., Govers F., MacKerron D.K.L., Taylor M.A., Ross H.A. Elsevier, Oxford, UK. pp. 77-86.
- Gebhardt C. and Valkonen J.P.T. (2001): Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. Annual Reviews Phytopathology; 39:79-102.
- Genin S. (2010): Molecular traits controlling host range and adaptation to plants in *Ralstonia solanacearum*. New Phytologist; 187:920-928.
- Ghislain M., Andrade D., Rodríguez F., Hijmans R.J., Spooner D.M. (2006): Genetic analysis of the cultivated potato *Solanum tuberosum* L Phureja Group using RAPDs and nuclear SSRs. Theoretical and Applied Genetics; 113: 1515-1527.
- Ghislain M., Núñez J., del Rosario Herrera M., Pignataro J., Guzman F., Bonierbale D.M., Spooner D.M. (2009): Robust and highly informative microsatellite-based genetic identity kit for potato. Molecular Breeding 23;377-388.
- Ghislain M., Spooner D.M., Rodríguez F., Villamón F., Núñez J., Vásquez C., Waugh R. and Bonierbale M. (2004): Selection of highly informative and user-friendly microsatellites (SSRs) for genotyping of cultivated potato. Theoretical and Applied Genetics; 108:881-890.
- Gibson G., and Muse Spencer V. (2004): Introduzione alla genomica. Zanichelli Bologna.
- Glais L., Tribodet M., Kerlan C. (2005): Specific detection of the PVYN-W variant of Potato virus Y. Journal of Virological Methods; 125:131-136.
- Goff S.A. et al. (2002): A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). Science; 296:92-100.
- Goodstal F.J., Kohler G.R., Randall L.B., Bloom A.J., St.Clair D.A. (2005): A major QTL introgressed from wild *Lycopersicon hirsutum* confers chilling tolerance to cultivated tomato (*Lycopersicon esculentum*). Theoretical and Applied Genetics; 111:898-905.
- Gremme G., Brendel V., Sparks M.E., Kurtz S. (2005): Engineering a software tool for gene structure prediction in higher organisms. Information Software Technology; 47:965-978.
- Grewal T.S., Rossnagel B.G., Pozniak C.J., Scoles G.J. (2008): Mapping quantitative trait loci associated with barley net blotch resistance. Theoretical and Applied Genetics; 116:529-539.
- Guidot A., Elbaz M., Carrère S., Siri M.I., Pianzzola M.J., Prior P. and Boucher C. (2009): Specific genes from the potato brown rot strains of *Ralstonia solanacearum* and their potential use for strain detection. The American Phytopathological Society; 99:1105-1112.
- Gupta P.K., Rustgi S. and MirR R. (2008): Array-based high-throughput DNA markers for crop improvement. Heredity; 101:5-18.

- Haverkort A.J., Boonekamp P.M., Hutten R., Jacobsen E., Lotz L.A.P., Kessel G.J.T, Visser R.G.F., van der Vossen E.A.G. (2008): Societal costs of late blight in potato and prospects of durable resistance through cisgenic modification. *Potato Research*; 51:47-57.
- Hippolyte I., Bakry F., Seguin M., Gardes L., Rivallan R., Risterucci A.M, Jenny C., Perrier X., Carreel F., Argout X., Piffanelli P., Khan I. A, Miller R. NG, Pappas G. J., Mbéguié-A-Mbéguié D., Matsumoto T., De Bernardinis V., Huttner E., Kilian A., Baurens F-C., D'Hont A., Cote F., Courtois B. and Glaszmann J-C. (2010): A saturated SSR/DArT linkage map of *Musa acuminata* addressing genome rearrangements among bananas. *BioMed Central Plant Biology*; 10:65-83.
- Hofinger B.J., Hai-Chun J., Hammond-Kosack K. E., Kanyuka K. (2009): High-resolution melting analysis of cDNA-derived PCR amplicons for rapid and cost-effective identification of novel alleles in barley. *Theoretical and Applied Genetics*; 119:851-865.
- Hu L.J., Li G.R., Zeng Z.X., Chang Z.J., Liu C., Zhou J.P., Yang Z.J. (2011): Molecular cytogenetic identification of a new wheat-*Thinopyrum* substitution line with stripe rust resistance. *Euphytica*; 177:169-177.
- Hu X., Meacham T., Ewing L., Gray S.M., Karaseva A.V. (2009): A novel recombinant strain of *Potato virus Y* suggests a new viral genetic determinant of vein necrosis in tobacco. *Virus Research*; 143:68-76.
- Huaman Z. (1997): The potato. In *Biodiversity in trust: Conservation and use of Plant Genetic Resources in CGIAR Centers*. Edited by Fuccillo D., Sears L., and Stapleton P. Cambridge University Press, UK. pp. 21-28.
- Huamàn Z. and Spooner D.M. (2002): Reclassification of landrace populations of cultivated potatoes (*Solanum* sect. *Petota*). *American Journal of Botany* 89(6): 947-965.
- Huang S., van der Vossen E.A., Kuang H., Vleeshouwers V.G., Zhang N., Borm T.J., van Eck H.J., Baker B., Jacobsen E., Visser R.G. (2005): Comparative genomics enabled the isolation of the *R3a* late blight resistance gene in potato. *Plant Journal*; 42:251-61.
- Innan H, Terauchi R. and Miyashita N.T. (1997): Microsatellite polymorphism in natural populations of the wild plant *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*; 146:141-152.
- Iorizzo M., Aversano R., Bradeen J.M., Frusciante L. and Carputo D. (2011): Fertilization fitness and offspring ploidy in 3x x 2x matings in potato. *Plant Biosystems*; 1-5.
- Iorizzo M., Mann H., D'agostino N., Chiusano M., Miraglia V., Bradeen J.M. and Carputo D. (2009): Comparative structural genomics between incongruent wild potato species. Abstract 1-17 del 53° Congresso annuale della Società Italiana di Genetica Agraria (SIGA) (Torino 16/19 settembre).
- Iovene M., Aversano R., Savarese S., Caruso I., Di Matteo A., Cardi T., Frusciante L., Carputo D. (2011): Somatic hybrids between *Solanum bulbocastanum* and *S. tuberosum* and their haploidization for potato breeding. *Biologia Plantarum* - in press.

- Iovene M., Barone A., Frusciante L., Monti L. and Carputo D. (2004): Selection for aneuploid *Solanum commersonii*-*S. tuberosum* hybrids combining low wild genome content and resistance traits. *Theoretical and Applied Genetics*; 119:1139-1146.
- Iovene M., Wielgus S.M., Simon P.W., Buell C.R. and Jiang J. (2008): Chromatin structure and physical mapping of chromosome 6 of potato and comparative analyses with tomato. *Genetics*; 180:1307-1317.
- Jaccoud D., Peng K., Feinstein D. and Kilian A. (2001): Diversity Arrays: a solid state technology for sequence information independent genotype. *Nucleic Acids Research*; 29:e25.
- Jacob H.J., Lindpaintner K., Lincoln S.E., Kusumi K., Bunker R.K., Mao Y.P., Ganten D., Dzau V.J., Lander E.S. (1991): Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Cell*; 67:213-224.
- Jacobsen E. and Schouten H.J. (2007): Cisgenesis strongly improves introgression breeding and induced translocation breeding of plants. *Trends in Biotechnology*; 25:219-223.
- Jacobsen E. and Schouten H.J. (2008): Cisgenesis, a new tool for traditional plant breeding, should be exempted from the regulation on genetically modified organisms in a step by step approach. *Potato Research*; 51:75-88.
- Jaillon O. et al. (2007): The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature*; 449:463-467.
- James K., Schneider H., Ansell S.W., Evers M., Robba L., Uszynski G., Pedersen N., Newton A.E., Russell S.J., Vogel J.C., Kilian A. (2008): Diversity Arrays Technology (DArT) for pan-genomic evolutionary studies of non-model organisms. *PLoSOne*; 3:e1682-e1693.
- Jansky S.H. (2006): Overcoming hybridization barriers in potato. *Plant Breeding*; 125:1-12.
- Jansky S.H. (2009): Potato improvement using exotic germplasm: Prospects and challenges *Common Tater*; 61:16-18.
- Jansky S.H., Simon R. and Spooner D.M. (2008): A Test of Taxonomic Predictivity: Resistance to early blight in wild relatives of cultivated potato. *Phytopathology*; 98:680-687.
- Jauhar P.P. Peterson T.S., Xua S.S. (2009): Cytogenetic and molecular characterization of a durum alien disomic addition line with enhanced tolerance to *Fusarium* head blight. *Genome*; 52: 467-483.
- Johnson M., Zaretskaya I., Raytselis Y., Merezuk Y., McGinnis S. and Madden T.L. (2008): NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Research*; 36:W5-W9.
- Johnston S.A., Den Nijs T.P.M., Peloquin S.J. and Hanneman R.E. (1980): The significance of genic balance to endosperm development in interspecific crosses. *Theoretical and Applied Genetics*; 57:5-9.

- Jones R.A.C. (1990): Strain group specific and virus specific hypersensitive reactions to infection with potyviruses in potato cultivars. *Annals of Applied Biology*; 117:93-105.
- Kalinowski S.T. (2004): Counting alleles with rarefaction: private alleles and hierarchical sampling designs. *Conservation Genetics*; 5:539-543.
- Karasev A.V., Nikolaeva O.V., Hu X., Sielaff Z., Whitworth J., Lorenzen J.H., Gray S.M. (2010): serological properties of ordinary and necrotic isolates of *Potato virus Y*: a case study of PVY^N misidentification. *American Journal of Potato Research*; 87:1-9.
- Kasai K., Morikawa Y., Sorri V.A., Valkonen J.P., Gebhardt C., Watanabe K.N. (2000): Development of SCAR markers to the PVY resistance gene *Ry^{adg}* based on a common feature of plant disease resistance genes. *Genome*; 43:1-8.
- Kawasaki T., Satsuma H., Fujie M., Usami S., Yamada T. (2007): Monitoring of phytopathogenic *Ralstonia solanacearum* cells using green fluorescent protein-expressing plasmid derived from bacteriophage ϕ RSS1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*; 104:451-456.
- Knapp S., Bohs L., Nee M. and Spooner D.M. (2004): *Solanaceae* – a model for linking genomics with biodiversity. *Comparative and Functional Genomics*; 5:285-291.
- Kosmala A., Zwierzykowski Z., Gąsior D., Rapacz M., Zwierzykowska E., Humphreys M.W. (2006): GISH/FISH mapping of genes for freezing tolerance transferred from *Festuca pratensis* to *Lolium multiflorum*. *Heredity*; 96:243-251.
- Kumar L.S. (1999): DNA markers in plant improvement: An overview. *Biotechnology Advances*; 17:143-182.
- Labate J.A. and Baldo A.M. (2005): Tomato SNP discovery by EST mining and resequencing. *Molecular Breeding*; 16:343-349.
- Laferriere L.T., Helgeson J.P., Allen C. (1999): Fertile *Solanum tuberosum*+*S. commersonii* somatic hybrids as sources of resistance to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Theoretical and Applied Genetics*; 98:1272-1278.
- Lahaye T., (2004): Illuminating the molecular basis of gene-for-gene resistance; *Arabidopsis thaliana RRS1-R* and its interaction with *Ralstonia solanacearum* popP2. *Trends in plant Science*; 9:1-4.
- Le Romancer M., Kerlan C., Nedellec M. (1994): Biological characterization of various geographical isolates of potato virus Y inducing superficial necrosis on potato tubers. *Plant Pathology*; 43:138-144.
- Lee J.M., Nahm S.H., Kim Y.M. and Kim B.D. (2004): Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. *Theoretical and Applied Genetics*; 108:619-627.
- Lehmensiek A., Sutherland M.W., McNamara R.B. (2008): The use of high resolution melting (HRM) to map single nucleotide polymorphism markers linked to a covered smut resistance gene in barley. *Theoretical and Applied Genetics*; 117:721-728.

- Lei M., Li G., Zhang S., Liu C. and Yang Z. (2011): Molecular cytogenetic characterization of a new wheat *Secale africanum* 2Ra(2D) substitution line for resistance to stripe rust. *Journal of Genetics*; 90: 283-287.
- Li T.H., Li Y.X., Li Z.C., Zhang H.L., Qi Y.W., Wang T. (2008): Simple sequence repeat analysis of genetic diversity in primary core collection of peach (*Prunus persica*). *Journal of Integrative Plant Biology*: 50:102-110.
- Liu J., Xu X. and Deng X. (2005): Intergeneric somatic hybridization and its application to crop genetic improvement. *Plant Cell Tissue and Culture*; 82:19-44.
- Llop P., Caruso P., Cubero J., Morente C. and López. M.M. (1999): A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. *Journal of Microbiological Methods*; 37:23-31.
- Lokossou A.A., Rietman H., Wang M., Krenek P., van der Schoot H., Henken B., Hoekstra R., Vleeshouwers V.G.A.A., van der Vossen E.A.G., Visser R.G.F., Jacobsen E., and Vosman B. (2010): Diversity, distribution, and evolution of *Solanum bulbocastanum* late blight resistance genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions*; 23:1206-1216
- Ma K.H., Kim N.S., Lee G.A., Lee S.Y., Lee J.K., Yi J.Y., Park Y.J., Kim T.S., Gwag J.G. and Kwon S.J. (2009): Development of SSR markers for studies of diversity in the genus *Fagopyrum*. *Theoretical and Applied Genetics*; 119:1247-1254.
- Mackay J.F., Wright C.D., Bonfiglioli R.G. (2008): A new approach to varietal identification in plants by microsatellite high resolution melting analysis: application to the verification of grapevine and olive cultivars. *Plant Methods*; 4:8.
- Mader E., Lukas B., Novak J. (2008): A strategy to setup codominant microsatellite analysis for high-resolution-melting-curve-analysis (HRM). *BioMed Central Genetics*; 9:69.
- Malcolmson J.F. and W. Black (1966): New R genes in *Solanum demissum* lindl. and their complementary races of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Euphytica*; 15:199-203.
- Mann H., Iorizzo M., Goa L., D'Agostino N., Carputo D., Chiusano M.L. and Bradeen J. (2011): Molecular linkage maps: strategies, resources and achievements. In "Genetics, genomics and breeding of potato". Edited by Bradeen J.M. e Kole C. CRC Press Madison (NY); 68-89.
- Mewes H.W., Albermann K., Bähr M., Frishman D., Gleissner A., Hani J., Heumann K., Kleine K., Maierl A., Oliver S.G., Pfeiffer F. and Zollner A. (1997): Overview of the yeast genome. *Nature*; 387:7-65.
- Michelmore R.W (2003): The impact zone: genomics and breeding for durable disease resistance. *Current Opinion in Plant Biology*; 6:397-404.
- Mochida K. and Shinozaki K. (2010): Genomics and bioinformatics resources for crop improvement. *Plant and Cell Physiology*; 51:497-523.

- Moisan-Thierry M., Marhadour S., Kerlan M.C., Dessenne N., Perramant M., Gokelaere T. (2005): Potato cultivar identification using simple sequence repeats markers (SSR). *Potato Research*; 48:191-200.
- Monforte A.J., Friedman E., Zamir D. and Tanksley S.D. (2001): Comparison of a set of allelic QTL-NILs for chromosome 4 of tomato: deductions about natural variation and implications for germplasm utilization. *Theoretical and Applied Genetics*; 102:572-590.
- Moose S.P. and Mumm R.H. (2008): Molecular plant breeding as the foundation for 21st Century Crop Improvement. *Plant Physiology*; 147:969-977.
- Morozova O., and Marra M. A. (2008): Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. *Genomics*; 92:255-264.
- Mueller L.A. et al. (2009): A snapshot of the emerging tomato genome sequence. *The Plant Genome*; 2:78-92.
- Mueller L.A., Solow T.H., Taylor N., Skwarecki B., Buels R.M., Menda N., Binns J., Lin C., Wright M.H., Ahrens R., Wang Y., Herbst E.V., Keyder E.R., Zamir D., Tanksley S.D. (2005): The SOL Genomics Network. A comparative resource for *Solanaceae* biology and beyond. *Plant Physiology* 138:1310-1317.
- Murashige T. and Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Neumann K., Kobiljski B., Denc'ic' S., Varshney R.K, Bo'rner A. (2011): Genome-wide association mapping: a case study in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Molecular Breeding*; 27:37-58.
- Oliver R.E., Jellen E.N., Ladizinsky G., Korol A.B., Kilian A., Beard J.L., Dumlupinar Z., Wisniewski-Morehead N.H., Svedin E., Coon M., Redman R.R., Maughan P.J., Obert D.E., Jackson E.W. (2011): New Diversity Arrays Technology (DArT) markers for tetraploid oat (*Avena magna* Murphy et Terrell) provide the first complete oat linkage map and markers linked to domestication genes from hexaploid *A. sativa* L. *Theoretical and Applied Genetics*; 123:1159-71.
- Ortiz R., Franco J., Iwanaga M. (1997): Transfer of resistance to potato cyst nematode (*Globodera pallida*) into cultivated potato *Solanum tuberosum* through first division restitution 2n pollen. *Euphytica*; 96:339-344.
- Park T.H., Vleeshouwers V.G.A.A., Jacobsen E., Van Der Vossen E., Visser R.G.F. (2009): Molecular breeding for resistance to *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in potato (*Solanum tuberosum* L.): a perspective of cisgenesis. *Plant Breeding*; 128: 109-117.
- Parrella G., Nappo A.G., Sorrentino R., Alioto D., (2011): Detection and characterization of PVY^{NTN} and PVY^{Ob} isolates from Southern Italy. 4th Conference of the International Working Group on Legume and Vegetable Viruses (IWGLVV), Antequera, Malaga, Spain, May 17-20, p. 106.

- Pascarella S., Paiardini A., (2010): Bioinformatica dalla sequenza alla struttura delle proteine. Zanichelli Bologna.
- Paterson A.H. et al. (2009): The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. *Nature*; 457:551-556.
- Pavek J.J. and Corsini D.L. (2001): Utilization of potato genetic resources in variety development. *American Journal of Potato Research*; 78:433-441.
- Peakall, R. and Smouse P.E. (2006): GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*; 6:288-295.
- Peleman J.D. and van der Voort J.R. (2003): Breeding by Design. *Trends in Plant Science*; 8:330-334.
- Piperidis G., Piperidis N., D'Hont A. (2010): Molecular cytogenetic investigation of chromosome composition and transmission in sugarcane. *Molecular Genetic and Genomics* 284:65-73.
- Plaisted, R.L., Tingey W.M., and Steffens J.C. (1992): The germplasm release of NYL235-4, a clone with resistance to the Colorado Potato Beetle. *American Journal of Potato*; 69:843-846.
- Potato Genome Sequencing Consortium (2011): Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature*; 475:189-195.
- Rafalski A. (2002): Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Current Opinion in Plant Biology*; 5:94-100.
- Reed G.H., Kent J.O., Wittwer C.T. (2007): High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*; 8:597-608.
- Remington D.L., Thornsberry J.M., Matsuoka Y., Wilson L.M., Whitt S.R., Doebley J. (2001): Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 98:11479-11484.
- Rigotti S. and Gugerli P. (2007): Rapid identification of potato virus Y strains by one-step triplex RT-PCR. *Journal of Virological Methods*; 140:90-4.
- Rohlf F.J. (2000): NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system. Exeter Software, Setauket, NY.
- Rossi M., Goggin F.L., Milligan S.B., Kaloshian I., Ullman D.E., and Williamson V.M. (1998): The nematode resistance gene *Mi* of tomato confers resistance against the potato aphid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*; 95: 9750-9754.
- Ruiz de Galarreta J.I., Barandalla L., Rios D.J., Lopez R., Ritter E. (2011): Genetic relationships among local potato cultivars from Spain using SSR markers. *Genetic Resource Crop Evolution*; 58:383-395.

- Sanseverino W., Roma G., De Simone M., Faino L., Melito S., Stupka E., Frusciante L. and Ercolano M.R., (2009): PRGdb: a bioinformatics platform for plant resistance gene analysis. *Nucleic Acids Research*; 38:1-8.
- Schnable et al. (2009): The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science*; 326: 1112-1115.
- Seal S.E., Jackson L.A., Young J.P.W. and Daniels M.J. (1993): Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and the Blood Disease Bacterium by partial 16s rRNA sequencing: construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. *Journal of General Microbiology*; 139:1587-1594.
- Shendure J. and Ji H. (2008): Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*; 26:1134-1145.
- Singh P.K., Mergoum M., Adhikari T.B., Shah T., Ghavami F., Kianian S.F. (2009): Genetic and molecular analysis of wheat tan spot resistance effective against *Pyrenophora tritici-repentis* races 2 and 5. *Molecular Breeding*; 25:369-379.
- Singh R.P., Valkonen J.P.T., Gray S.M., Boonham N., Jones R.A.C., Kerlan C., Schubert J. (2008): Discussion paper: the naming of *Potato virus Y* strains infecting potato. *Archives of Virology*; 153: 1-13.
- Sokal R.R. and Michener C.D. (1958): A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Scientific Bulletin*; 28:1409-1438.
- Soltis P.S. and Soltis D.E. (2009): The role of hybridization in plant speciation. *Annual Review of Plant Biology*; 60:561-88.
- Song Y.S. and Schwarzfischer A. (2008): Development of STS markers for selection of extreme resistance (Rysto) to PVY and maternal pedigree analysis of extremely resistant cultivars. *American Journal of Potato Research*; 85:159-170.
- Spooner D., and R. Castillo T. (1997): Reexamination of series relationships of South American wild potatoes (*Solanaceae*: *Solanum* sect. *Petota*): evidence from chloroplast DNA restriction site variation. *American Journal of Botany*; 84:671-685.
- Spooner D.M. and Hijmans R.J. (2001): Potato systematics and germplasm collecting, 1989-2000. *American Journal of Potato Research*; 78:237-268.
- Spooner D.M., McLean K., Ramsay G., Waugh R., Bryan G.J. (2005): A single domestication for potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 102:14694-14699.
- Spooner D.M., Núñez J., Trujillo G., del Rosario Herrera M., Guzmán F., Ghislain M. (2007): Extensive simple sequence repeat genotyping of potato landraces supports a major reevaluation of their gene pool structure and classification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 104:19398-19403.

- Stich B., Melchinger A.E., Frisch M., Maurer H.P., Heckenberger M., Reif J.C. (2005): Linkage disequilibrium in European elite maize germplasm investigated with SSRs. *Theoretical and Applied Genetics*; 111:723-730.
- Tang J., Ohyama K., Kawaura K., Hashinokuchi H., Kamiya Y., Suzuki M., Muranaka T. and Ogihara Y. (2011): A new insight into application for barley chromosome addition lines of common wheat: achievement of stigmaterol accumulation. *Plant Physiology*; 157:1555-1567.
- Tang L., Kim M.D., Yang K.S., Kwon S.Y., Kim S.H., Kim J.S., Yun D.J., Kwak S.S. and Lee H.S. (2008): Enhanced tolerance of transgenic potato plants overexpressing nucleoside diphosphate kinase 2 against multiple environmental stresses. *Transgenic Research*; 17:705-715.
- Tanksley S.D., Ganai M.W., Prince J.P., de Vicente M.C., Bonierbale M.W., Broun P., Fulton T. M., Giovannoni J.J., Grandillo S., Martin G.B., Messeguer R., Miller J.C., Miller L., Paterson A. H., Pineda O., Riider M.S., Wing R.A., Wu W. and Young N. D. (1992): High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics*; 132:1141-1160.
- Tanksley S.D., Ganai M.W., Prince J.P., de-Vicente M.C., Bonierbale M.W., Broun P., Fulton T.M., Giovannoni J.J., Grandillo S., Martin G.B., Messeguer R., Miller J.C., Miller L., Paterson A.H., Pineda O., Roder M.S., Wing R.A., Wu W. and Young N.D. (1992): High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics*; 132:1141-1160.
- Taramino G. and Tingey S. (1996): Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize. *Genome*; 39:277-287.
- Tek A.L., Stevenson W.R., Helgeson J.P., Jiang J. (2004): Transfer of tuber soft rot and early blight resistances from *Solanum brevidens* into cultivated potato. *Theoretical and Applied Genetics*; 109:249-254.
- The *C. elegans* Sequencing Consortium (1998): Genome sequence of the nematode *Caenorhabditis elegans*: a platform for investigating biology. *Science*; 282:2012-2018.
- Thieme R., Rakosy-Tican E., Nachtigall M., Schubert J., Hammann T., Antonova O., Gavrilenko T., Heimbach U., Thieme T. (2010): Characterization of the multiple resistance traits of somatic hybrids between *Solanum cardiophyllum* Lindl. and two commercial potato cultivars. *Plant Cell Reports*; 29:1187-1201.
- Tinker N.A, Andrzej K., Wight C.P., Heller-Uszynska K., Wenzl P., Rines H.W., Bjørnstad Å., Howarth C.J., Jannink J-L, Anderson J.M., Rossnagel B.G., Stuthman D.D., Sorrells M.E., Jackson E.W., Tuveson S., Kolb F.L., Olsson O., Federizzi L.C., Carson M.L., Ohm H.W., Molnar S.J., Scoles G.J., Eckstein P.E., Bonman J.M., Ceplitis A. and Langdon T. (2009): New DArT markers for oat provide enhanced map coverage and global germplasm characterization. *BioMed Central Genomics*; 10:39.
- Tsujimoto H. (2001): Production of Near-Isogenic Lines and Marked Monosomic Lines in common wheat (*Triticum aestivum*) cv. chinese spring. *Journal of Heredity*; 92:254-259.

- Tuscan et al. (2006): The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). Science; 313:1596-1604.
- Valle G., Citterich M.H., Attimonelli M., Pesole G. (2003): Introduzione alla bioinformatica. Zanichelli Bologna.
- Van Den Berg G., Bryan J., Del Rio A., Spooner M. (2002): Reduction of species in the wild potato *Solanum* section *Petota* series *Longipedicellata*: AFLP, RAPD and chloroplast SSR data. Theoretical and Applied Genetic; 105:1109-1114.
- Van Der Vossen E., Sikkema A., Hekkert B.teL.1, Gros J., Stevens P., Muskens M., Wouters D., Pereira A., Stiekema W., Allefs S. (2003): An ancient R gene from the wild potato species *Solanum bulbocastanum* confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato. Plant Journal; 36:867-882.
- van der Vossen E.A., Gros J., Sikkema A., Muskens M., Wouters D., Wolters P., Pereira A., Allefs S. (2005): The *Rpi-blb2* gene from *Solanum bulbocastanum* is an *Mi-1* gene homolog conferring broad-spectrum late blight resistance in potato. Plant Journal; 44:208-22.
- van der Wolf J. and De Boer S.H. (2007): Bacterial pathogens of potato. In Potato Biology and Biotechnology: advances and perspectives. Edited by Vreugdenhil D., Bradshaw J., Gebhardt C., Govers F., MacKerron D., Taylor M. and Ross H. Elsevier, Oxford, UK. pp.
- Varshney R.K., Glaszmann J.C., Leung H. and Ribaut J.M. (2010): More genomic resources for less-studied crops. Trends in Biotechnology; 28:452-460.
- Velasco et al. (2010): The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). Nature Genetics; 42:833-839.
- Vidal S., Cabrera H., Andersson R.A., Fredriksson A., Valkonen J.P. (2002): Potato gene *Y-1* is an *N* gene homolog that confers cell death upon infection with potato virus Y. Molecular Plant Microbe Interaction; 15:717-27.
- Vleeshouwers V. G.A.A., Finkers R., Budding D., Visser M., Jacobs M. MJ, van Berloo R., Pel M., Champouret N., Bakker E., Krenek P., Rietman H., Huigen D., Hoekstra R., Goverse A., Vosman B., Jacobsen E. and Visser R. GF (2011): SolRgene: an online database to explore disease resistance genes in tuber-bearing *Solanum* species. BMC Plant Biology; 11:116-123.
- Vossen R.H.A.M., Aten E., Roos A. and den Dunnen J.T. (2009): High-Resolution Melting analysis (HRMA)-more than just sequence variant screening. Human Mutation; 30:860-866.
- Wang M., Allefs S., van den Berg R.G., Vleeshouwers V.G., van der Vossen E.A., Vosman B. (2008): Allele mining in *Solanum*: conserved homologues of *Rpi-blb1* are identified in *Solanum stoloniferum*. Theoretical and Applied Genetics; 116:933-43.
- Watanabe K.N. (2002): Challenges in biotechnology for abiotic stress tolerance on roots and tubers. JIRCAS Working Report; 75-83.

- Wenzl P., Carling J., Kudrna D., Jaccoud D., Huttner E., Kleinhofs A. and Kilian A. (2004): Diversity arrays technology (DArT) for whole-genome profiling of barley. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101:9915-9920.
- Wenzl P., Li H., Carling J., Zhou M., Raman H., Paul E., Hearnden P., Maier C., Xia L., Caig V., Ovesná J., Cakir M., Poulsen D., Wang J., Raman R., Smith K. P., Muehlbauer G.J., Chalmers K.J., Kleinhofs A., Huttner E. and Kilian A. (2006): A high-density consensus map of barley linking DArT markers to SSR, RFLP and STS loci and agricultural traits. *BioMed Central Genomics*; 7:206-228.
- Wojdacz T.K. and Dobrovic A., (2007): Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acid Research*; 35:e41.
- Wu F., Eannetta N.T., Xu Y., Durrett R., Mazourek M., Jahn M.M., Tanksley S.D. (2009a): A COSII genetic map of the pepper genome provides a detailed picture of synteny with tomato and new insights into recent chromosome evolution in the genus *Capsicum*. *Theoretical and Applied Genetics*; 118:1279-1293.
- Wu F., Eannetta N.T., Xu Y., Plieske J., Ganai M., Pozzi C., Bakaher N., Tanksley S.D. (2010): COSII genetic maps of two diploid *Nicotiana* species provide a detailed picture of synteny with tomato and insights into chromosome evolution in tetraploid *N. tabacum*. *Theoretical and Applied Genetics*; 120:809-827.
- Wu F., Eannetta N.T., Xu Y., Tanksley S.D. (2009b): A detailed synteny map of the eggplant genome based on conserved ortholog set II (COSII) markers. *Theoretical and Applied Genetics*; 118: 927-935.
- Wu F., Mueller L.A., Crouzillat D., Pétiard V., Tanksley S.D. (2006): Combining bioinformatics and phylogenetics to identify large sets of single-copy orthologous genes (COSII) for comparative, evolutionary and systematic studies: a test case in the Euasterid plant clade. *Genetics*; 174:1407-1420.
- Wu S-B., Wirthensohn M. G., Hunt P., Gibson J. P., Sedgley M. (2008): High resolution melting analysis of almond SNPs derived from ESTs. *Theoretical and Applied Genetics*; 118:1-14.
- Wydra K. and Beri H. (2007): Immunohistochemical changes in methyl-ester distribution of homogalacturonan and side chain composition of rhamnogalacturonan I as possible components of basal resistance in tomato inoculated with *Ralstonia solanacearum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*; 70:13-24.
- Xia L., Peng K.M., Yang S.Y., Wenzl P., de Vicente C.M., Fregene M. And Kilian A. (2005): DArT for high-throughput genotyping of Cassava (*Manihot esculenta*) and its wild relatives. *Theoretical and Applied Genetics*, 110:1092-1098.
- Yang C.H. and Ho G.D. (1998): Resistance and susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to Bacterial Wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Phytopatology*; 88:330-334.

- Yu J. et al. (2002): A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). Science; 296:79-92.
- Yuan J., Haroon M., Lightfoot D., Pelletier Y., Liu Q. and Qing Li X. (2008): A High-Resolution Melting Approach for Analyzing Allelic Expression Dynamics. Current Issue in Molecular Biology; 11 (Suppl. 1) i1–9.
- Zelenin A.V., Badaeva E.D. and Muravenko O.V. (2001): Introduction in to plant genomics. Molecular Biology; 35:285-293.
- Zhang H.Q., Yang R.W., Zhang L., Ding C.B., Zeng J. and Zhou Y.H., (2009): Genetic diversity and phylogeny in *Hystrix* (Poaceae, Triticeae) and related genera inferred from Giemsa C-banded karyotypes. Genetics and Molecular Biology; 32:521-527.